

(51) Int. Cl. ⁸	識別記号	P I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	
B C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	
16/46		16/46	

請求項の数34(全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-515142	(73) 特許権者	999999999
(86) (22) 出願日	平成 3 年(1991) 8 月28日		ジェンファーム インターナショナル, インコーポレイティド アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, バロ アルト, カリフォルニア アベニュー-855, スイート シー
(65) 公表番号	特表平6-500233	(72) 発明者	ロンバーク, ニルス
(43) 公表日	平成 6 年(1994) 1 月13日		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94111, サンフランシスコ, #1202, バ ッテリー ストリート 550
(86) 国際出願番号	PCT/US 91/06185	(72) 発明者	カイ, ロバート エム.
(87) 国際公開番号	WO 92/03918		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94111, サンフランシスコ, #2301, ジ ャクソン ストリート 155
(87) 国際公開日	平成 4 年(1992) 3 月19日	(74) 代理人	弁理士 松井 光夫
審査請求日	平成 8 年(1996) 10 月16日		審査官 小暮 道明
(31) 優先権主張番号	5 7 4, 7 4 8		
(32) 優先日	1990 年 8 月29日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	5 7 5, 9 6 2		
(32) 優先日	1990 年 8 月31日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異種免疫グロブリンを作る方法及びトランスジェニックマウス

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 トランスジェニックマウスからヒト重鎖を有する異種免疫グロブリンを作る方法において、該方法が

トランスジェニックマウスを予め選択した抗原と接触させること、ここで該トランスジェニックマウスはヒト配列V_Hセグメント遺伝子、ヒトDセグメント遺伝子及びヒトJ_Hセグメント遺伝子を有する少なくとも1つのトランスジェニックの生殖細胞系コピーを含むゲノムを有し、ここで該トランスジェニックはまた、μ 定常領域からのμ スイッチ 10
チドナール領域 5'、及びμ 定常領域とヒトγ 定常領域の間のヒトスイッチアクセプター領域を含み、該スイッチ配列は、生体内でのスイッチング及びヒトγ 重鎖ポリペプチドの産生を行うべく作動可能に結合されており、またここで該μ 及びγ 定常領域の間のヌクレオチドの数

2

が、天然のヒト生殖細胞系における対応するμ 及びγ 定常領域の間のヌクレオチドの数より小さい、及び該予め選択された抗原に結合する異種ヒトγ 免疫グロブリンを集めることを含む方法。

【請求項 2】 トランスジェニックマウスが、少なくとも1つのヒト軽鎖免疫グロブリントランスジェニックを含むゲノムを有し、ここで該軽鎖はカッパ軽鎖である請求項 1 の方法。

【請求項 3】 トランスジェニックが、2つのヒトV_H遺伝子セグメント、8つのヒトD遺伝子セグメント、6つのヒトJ_H遺伝子セグメント、ヒトJ-μ エンハンサー、ヒトμ スイッチ領域、ヒトμ エキシソンの完全なセット、ヒト不毛(ステライル)転写物プロモーター、ヒトスイッチ領域、ヒトC_Hエキソンの完全なセット、及び重鎖 3' エンハンサーを含む再配列されていないヒト重鎖トラン

スジェンであり、該再配列されていないヒト重鎖トランスジェンは、非ヒト V_H 遺伝子セグメント、非ヒトD遺伝子セグメント、及び非ヒト J_H 遺伝子セグメントを欠き；該トランスジェニックマウスのBリンパ細胞は該再配列されていないヒト重鎖トランスジェンをV-D-J連結化により再配列して、該トランスジェン上でエンコードされている μ 及び γ 定常領域へのイソタイプスイッチングによりポリペプチド結合において代替的に発現されるところのヒト重鎖可変領域をエンコードする、読み枠内で連結されたV-D-J遺伝子を作る、請求項1の方法。

【請求項4】読み枠内で連結された該V-D-J遺伝子が、上記トランスジェン上でエンコードされるヒト γ 定常領域へのポリペプチド結合において発現されるヒト重鎖可変領域をエンコードする、請求項3の方法。

【請求項5】読み枠内で連結された該V-D-J遺伝子がヒトDIR2遺伝子配列を含む請求項3の方法。

【請求項6】上記再配列されていないヒト重鎖トランスジェンがpHC1のNot I挿入断片を含む請求項3の方法。

【請求項7】上記トランスジェンがヒト VH 遺伝子セグメント $VH251$ 及び $VH105$ を含む請求項3の方法。

【請求項8】上記トランスジェニックマウスのゲノムがpHC1のNot I挿入断片を有するヒト重鎖トランスジェンを含み、ここで該トランスジェニックマウスはイソタイプスイッチングの結果として血清中にヒト μ 又はヒト γ *

5' CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TGC 3'

5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3'

【請求項13】上記トランスジェンがpHC1のNot I挿入断片を含み、かつ該トランスジェニックマウスが血清中にヒト μ 鎖及びヒト γ -1鎖の両者を発現する請求項1の方法。

【請求項14】異種免疫グロブリンを集める上記工程が、ヒト γ -1鎖を含む血清を集めることを含む請求項1の方法。

【請求項15】複数のヒト V_H 遺伝子セグメント、複数のヒトD遺伝子セグメント、複数のヒト J_H 遺伝子セグメント、免疫グロブリン重鎖エンハンサー、 μ 定常遺伝子セグメントから上流に位置される μ スイッチ領域を含む μ 定常領域、及びヒト γ 定常領域遺伝子セグメントから上流に位置される γ スイッチ領域を含む γ 定常領域を含む再配列されていないヒト重鎖免疫グロブリン小遺伝子座トランスジェンを含むゲノムを有するトランスジェニックマウスであって、ここで該トランスジェニックマウスのBリンパ細胞は、V-D-J連結化により上記再配列されていないヒト重鎖トランスジェンを再配列して、トランスジェン内イソタイプスイッチングにより、上記トランスジェン上で上記ヒト γ 定常領域遺伝子セグメントによりエンコードされた定常領域へのポリペプチド結合において発現される重鎖可変領域をエンコードする、

*-1鎖を発現し；各ヒト μ 又はヒト γ -1鎖は、ヒト V_H 遺伝子セグメント、ヒトD遺伝子セグメント及びヒト J_H 遺伝子セグメントによりエンコードされるポリペプチド配列を有する可変領域を含み、ここで該 V_H 、D及び J_H セグメントは読み枠内で結合されている、請求項3の方法。

【請求項9】上記トランスジェンが更に、ヒト γ -1重鎖遺伝子領域の5.3kb Hind III断片を含み、ここで該5.3kb Hind III断片は、ヒト γ -1スイッチ領域及びスイッチ前不毛転写物の第1エキソンを有する、請求項3の方法。

【請求項10】トランスジェンが更に、ヒト重鎖領域の0.7kb Xba I/Hind III断片を含み、ここで該0.7kb Xba I/Hind III断片は5.3kbのヒト γ -1スイッチ領域の直上流の配列を有する請求項9の方法。

【請求項11】トランスジェンが更に、ヒト重鎖領域の上記0.7kb Xba I/Hind III断片の直上流の配列を有する3.1kbのXba I断片を含む請求項10の方法。

【請求項12】上記トランスジェンが、関連するスイッチ領域及び不毛転写物に関連するエキソンを、不毛転写物開始部位の上流の約4kbの隣接配列ならびに下記オリゴヌクレオチドプライマーでPCR増幅せうる重鎖3'エンハンサーと共に含むヒト γ -1定常領域を含む請求項3の方法。

読み枠内で連結されたV-D-J遺伝子を作り；ここで上記小遺伝子座トランスジェンが、天然のヒト重鎖遺伝子座と比べて、上記 μ 及び上記 γ 遺伝子セグメントの間に少なくとも2kbの少なくとも1つの不連続性を有し；かつここで該マウスはヒトIgM重鎖及び、イソタイプスイッチングの結果として、ヒトIgG重鎖を発現するところの、上記トランスジェニックマウス。

【請求項16】上記ヒト重鎖トランスジェンが、 γ -1スイッチ領域及びスイッチ前不毛転写物の第1エキソンを含むヒト重鎖遺伝子座の5.3kbのHind III断片を含み、上記Bリンパ細胞は上記ヒト重鎖トランスジェンを再配列して読み枠内で連結されたV-D-J遺伝子形成して、上記トランスジェニックマウスのBリンパ細胞において上記ヒト γ 鎖定常領域へのポリペプチド結合において発現されるところの重鎖可変領域をエンコードする、請求項15のトランスジェニックマウス。

【請求項17】上記トランスジェンが更にヒト重鎖遺伝子座の0.7kbのXba I/Hind III断片を含み、該0.7kbのXba I/Hind III断片が上記5.3kbの γ -1断片の直上流の配列を有し、かつ上記トランスジェンが更に上記ヒト重鎖遺伝子座の、近隣の上流31kbのXba I断片を含む、請求項16のトランスジェニックマウス。

【請求項18】上記ヒト重鎖トランスジェンが、関連するスイッチ領域及び不毛転写物に関連するエキソンを、不毛転写物開始部位の上流の約4kbの隣接配列ならびに *

5' CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TGC 3'

5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3'

【請求項19】上記ヒト重鎖トランスジェンがpHClのNot I挿入断片を含む請求項18のトランスジェニックマウス。

【請求項20】上記ヒト重鎖トランスジェンがイソタイプスイッチングを受け、それにより上記の、読み枠内で連結されたV-D-J遺伝子がヒト重鎖可変領域をエンコードし、該ヒト重鎖可変領域は初めにヒト μ 定常領域へのペプチド結合において発現され、そして続いて、上記トランスジェニックマウスのBリンパ細胞においてヒト γ 定常領域へのペプチド結合において発現される請求項17のトランスジェニックマウス。

【請求項21】1トランスジェニックマウスのゲノムがpHClのNot I挿入断片を有するヒト重鎖トランスジェンを含むトランスジェニックマウスであって、その血清中にヒト μ 及びヒト γ -1免疫グロブリン鎖を発現するトランスジェニックマウス。

【請求項22】トランスジェニックマウスのゲノムがpHClのNot I挿入断片を有するヒト重鎖トランスジェンを含み、該トランスジェニックマウスは血清中にヒト配列 γ -1鎖を有する抗体を発現し、各ヒト γ -1鎖は、VDJ遺伝子として読み枠内連結されたヒト V_H 遺伝子セグメント、ヒトD遺伝子セグメント及びヒト J_H 遺伝子セグメントによりエンコードされたポリペプチド配列を有する可変領域を含むところのトランスジェニックマウス。

【請求項23】抗原刺激を受けるとトランスジェニックマウスが、再配列されたヒト小遺伝子座によりエンコードされる μ 鎖を有するIgMを発現する一次応答B細胞、及び再配列されたヒト小遺伝子によりエンコードされる γ 鎖を有する、体細胞突然変異されたIgGを発現する二次応答B細胞を発展するように重鎖免疫グロブリン小遺伝子座を形成するように、その生殖細胞系DNA中に組み込まれたヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座からのDNAセグメントを有するトランスジェニックマウスにおいて、該トランスジェニックマウスの生殖細胞系DNAが、複数のヒト重鎖V遺伝子セグメント、複数のヒト重鎖D遺伝子セグメント、複数のヒト重鎖J遺伝子セグメント、 μ コードセグメントから上流に位置される μ スイッチ領域を含む μ 定常領域、及びヒト γ コードセグメントから上流に位置される γ スイッチ領域を含む γ 定常領域を含む再配列されていないヒト免疫グロブリン小遺伝子座を含み、ここで γ 定常領域が、天然のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座中におけるよりも、 μ 定常領域により近く；

ここで上記抗原刺激の後に、IgMを発現する上記一次応

*下記オリゴヌクレオチドプライマーでPCR増幅されうるラット重鎖3'エンハンサーと共に含むヒト γ -1定常領域を含む請求項15のトランスジェニックマウス。

答B細胞が、上記 μ 定常領域及び上記ヒト γ 定常領域、及び上記再配列されていないヒト免疫グロブリン小遺伝子座のVDJ再配置から成る再配列された可変領域を含む染色体DNAを有し、ここで該再配列された可変領域は、上記ヒト重鎖V遺伝子セグメントとヒトD遺伝子セグメントとの間及び上記ヒトD遺伝子セグメントと上記ヒト重鎖Jセグメントとの間の組換え連結点にN領域ヌクレオチドを有し、かつここで上記再配列された可変領域のFR1、FR2、FR3、CDR1及びCDR2部分は上記再配列されていないヒト免疫グロブリン小遺伝子座の上記ヒト重鎖V遺伝子セグメントからのDNA配列を有し；

かつここで上記二次応答B細胞は、上記 μ 定常領域から、上記再配列された可変領域に作動可能に連結された上記 γ 定常領域へのクラススイッチ組換えを示す染色体DNAを有し；ここでFR1、FR2、FR3、CDR1及びCDR2部分に及び配列が上記再配列されていないヒト免疫グロブリン小遺伝子座からの対応する配列と同一でない複数のDNA配列を含むところのトランスジェニックマウス。

【請求項24】ヒト免疫グロブリン小遺伝子座が2~4のヒトVセグメント、2~15のヒトDセグメント及び2~6のヒトJセグメントから成る請求項23のトランスジェニックマウス。

【請求項25】ヒトスイッチ領域がヒト重鎖定常領域のHind III DNA断片内に含まれ、ここで該Hind III断片は、繰返しスイッチ配列及びヒトスイッチ前不毛転写物のための開始部位を含む請求項23のトランスジェニックマウス。

【請求項26】Hind III断片が、 γ スイッチ領域を含みかつヒト γ スイッチ前不毛転写物のための開始部位を更に含む約5.3kbのヒトHind III断片である請求項25のトランスジェニックマウス。

【請求項27】ヒト免疫グロブリン重鎖小遺伝子座が、重鎖J- μ イントロンエンハンサーを更に含む請求項23のトランスジェニックマウス。

【請求項28】ヒト免疫グロブリン小遺伝子座が、免疫グロブリン重鎖3'エンハンサーを更に含む請求項23のトランスジェニックマウス。

【請求項29】二次応答B細胞が、 μ コード領域を欠き、かつ上記 γ スイッチ領域に隣接する上記 μ スイッチ領域を有する請求項23のトランスジェニックマウス。

【請求項30】複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、ヒト μ C μ 遺伝子、少なくとも2つの互に異なるヒト γ C γ 遺伝子、及び関連するイソタイプスイッチング配列を作動可能結合中に含むトランスジ

エンを、ゲノム中に含むトランスジェニックマウスであって、ここでヒト μ 及びヒト γ スイッチ配列は、天然に生じるヒト免疫グロブリン遺伝子座におけるよりも互に接近して位置され；かつ該マウスのリンパ細胞においてトランスジェンは、マウスが抗原刺激に反応して少なくとも3つのヒト重鎖イソタイプの免疫グロブリンを含む血清を作るように、ヒト μ 及びヒト γ スイッチ配列の間の組換えにより産生的VDJ再配置及び μ から γ へのイソタイプスイッチングを受けるところのトランスジェニックマウス。

【請求項31】該リンパ細胞のゲノムが更にヒト軽鎖トランスジェンを有する請求項30のトランスジェニックマウス。

【請求項32】血清が、ヒト $\gamma 1$ 及びヒト κ より成るIgGのサブ集団、ならびにヒト $\gamma 3$ 及びヒト κ より成るIgGのサブ集団を含むIgGの集団を含む請求項31のトランスジェニックマウス。

【請求項33】ヒト γ スイッチ配列が、ヒト重鎖定常領域の約5.3kbのHind III断片内に含まれている請求項30のトランスジェニックマウス。

【請求項34】ヒト γ スイッチ配列が、ヒト重鎖定常領域の約4kbのHind III断片内に含まれている請求項30のトランスジェニックマウス。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物、そのようなトランスジェニック動物を産生するのに使うトランスジェン (transgene)、異種抗体を産生することのできる不死化B細胞、内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊するための方法およびベクター、合成免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントレパートリーの作製方法、並びに異種抗体産生を誘導する方法に関する。

発明の背景

ヒトにおけるモノクローナル抗体の生体内適用の開発に直面する主な障害の1つは、非ヒト免疫グロブリンの本質的免疫原性である。患者は齧歯類免疫グロブリン配列に対して抗体を産生することにより齧歯類モノクローナル抗体の治療用量に反応する。それらのヒト抗マウス抗体 (HAMA) は治療抗体を中和し、急性毒性を引き起こし得る。HAMA応答は免疫不全患者ではあまり過激でない。従って、本質的免疫原性は、患者の免疫応答の一次的弱化を必要とする移植拒絶反応の治療への齧歯類モノクローナル抗体の使用を妨害している。齧歯類抗体は、免疫不全症を含む或る種のリンパ腫を治療するためにも有用なことがある。しかしながら、免疫不全患者でさえも、安全性や効能の低下を引き起こすHAMA応答を開始し得る。

モノクローナル抗体を作製するための現在の技術は、動物 (通常はラットまたはマウス) を抗原に予備暴露す

るか、または抗原で感作せしめることを伴う。この予備暴露は、抗原に対して高親和性を有する免疫グロブリン分子を分泌する脾性B細胞の形成をもたらす。感作動物の脾細胞を次いでミエローマ細胞と融合せしめ、不死の抗体分泌性ハイブリドーマ細胞を形成せしめる。個々のハイブリドーマクローンをスクリーニングして、特定抗原に対して向けられた免疫グロブリンを産生する細胞を同定する。

個々の抗体遺伝子の遺伝子工学は既に提案されている。2つの遺伝子工学アプローチが報告されている：キメラ抗体および相補性決定領域 (CDR) 移植。最も単純なアプローチであるキメラ抗体は、抗体分子の可変部分と定常部分が別々のエクソン上にコードされるという事実を利用する。再配列されたマウス抗体遺伝子の可変領域エクソンをヒト定常領域エクソンと単純に融合せしめることにより、ハイブリッド抗体遺伝子を得ることができる [Morrison, S. L. ら (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6851-6855]。このアプローチの主な問題点は、高度に免疫原性のマウスFc領域は排除されるけれども、残りのマウスFab配列がまだ免疫原性であることである [Bruggemann ら (1989), *J. Exp. Med.*, **170**, 2153-2157]。CDR移植アプローチは、コンピューターモデルを使って完全に人工的な抗体を作製する。該抗体の中の唯一のマウス配列は抗原結合に関与するものである [Riechmann, L. ら (1988), *Nature*, **332**, 323-327]。それらの各アプローチは、着目の抗原に対して向けられた齧歯類モノクローナル抗体の事前の特徴付けを必要とし、両者とも操作された抗体を高レベルで産生するトランスフェクトされた安定な細胞系の作製を必要とする。

ヒト抗体の産生のための別のアプローチは、免疫グロブリンcDNA配列を含む細菌発現ライブラリーの作製を伴う提案である [Orlandi ら (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3833-3837 および Huse ら (1989), *Science*, **246**, 1275-1281]。この技術は、報告によれば、マウスcDNA配列由来の抗体断片を作製するためにのみ使われている。

多数の実験は、Ig遺伝子配列に必要な特異的DNA配列を判定するためのトランスフェクトされた細胞系の使用を報告している [Lewis および Gellert (1989), *Cell*, **59**, 585-588]。そのような報告は推定上の配列を同定し、そして再配列に使う組換え酵素へのそれらの配列の近づきやすさ (accessibility) が転写により変更されると結論づけている [Yancopoulos および Alt (1985), *Cell*, **40**, 271-281]。V (D) J 結合のための配列は、報告によれば、高度に保存されたほぼ回文式のヘプタマーと、12または23bpのいずれかのスペーサーにより隔てられたあまり保存されていない高ATナノマーである [Tonegawa (1983), *Nature*, **302**, 575-581; Hesse ら (1989), *Genes in Dev.*, **3**, 1053-1061]。効率的組換えは、伝えられるところによれば、異なる長さのスペーサ

一領域を有する組換えシグナル配列を含む部位の間でのみ起こる。

種々の形態の免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスの製造も報告されている。再配列されたマウス免疫グロブリン重鎖または軽鎖遺伝子がトランスジェニックマウスの作製に使われている。そのようなトランスジェンは、報告によれば、内因性Ig遺伝子の再配列を排除することができる。例えばWeaverら (1985), *Cell*, 42, 117-127; Iglesiasら (1987), *Nature*, 330, 482-484; Storbら (1985), *Banbury Reports*, 20, 197-207; Neubergerら (1989), *Nature*, 338, 350-352; Hagmanら (1989), *J. Exp. Med.*, 169, 1911-1929; 並びに Storbら (1989), *Immunoglobulin Genes*, Academic Press, T. Honjo, F. W. Alt および T. H. Rabbitts 編, 303-326頁を参照のこと。加えて、 μ または γ 1 定常領域を含む機能的に再配列されたヒトIg遺伝子がトランスジェニックマウス中で発現されている。Yamamuraら (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2152-2156; Nussenzweigら (1987), *Science*, 236, 816-819を参照のこと。 μ 再配列重鎖遺伝子の場合、内因性免疫グロブリン遺伝子座の対立遺伝子排除が報告されている。

しかしながら、対立遺伝子排除は、全てのトランスジェニックB細胞において常に起こるものではない。例えばRathら (1989), *J. Immunol.*, 143, 2074-2080 (再配列された μ 遺伝子構成物); Manzら (1988), *J. Exp. Med.*, 168, 1363-1381 (経膜エクソンを欠く μ トランスジェンは内因性遺伝子の再配列を防止しなかった); Ritchieら (1984), *Nature*, 312, 517-520; Storbら (1986), *J. Immunol. Rev.*, 89, 85-102 (安定な重鎖/軽鎖複合体を形成することのできる再配列された κ トランスジェンを発現するトランスジェニックマウスは、B細胞中で内因性 κ 遺伝子のみを再配列し、内因性重鎖遺伝子を正しく再配列することができない); およびManzら (1988), *J. Exp. Med.*, 168, 1363-1381 (重鎖と結合できない軽鎖をコードする κ 遺伝子を含むトランスジェニックマウスは、低レベルの対立遺伝子排除のみを示す)を参照のこと。Nussenzweigら (1988), *Nature*, 336, 446-450; Durdikら (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2346-2350; およびShimizuら (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8020-8023も参照のこと。

高度免疫化トランスジェニックマウス中での15kbマウス κ 遺伝子構成物 [O'Brienら (1987), *Nature*, 326, 405-409; Storb (1989), *Immunoglobulin Genes*, Academic Press, T. Honjo, F. W. Alt および T. H. Rabbitts 編, 303-326頁] および μ 重鎖トランスジェンの可変部分 [Durdikら (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2346-2350] における体細胞突然変異も報告されている。

Ig遺伝子再配列は、組織培養細胞において研究されているが、トランスジェニックマウスでは詳しく研究されていない。マウス中に導入された再配列試験構成物を記

載している少数の報告が発表されているに過ぎない [Buchiniら (1987), *Nature*, 326, 409-411 (再配列されていないニワトリ δ トランスジェン); Goodhartら (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4229-4233 (再配列されていないウサギ κ 遺伝子); およびBruggemannら (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6709-6713 (ハイブリッドマウス-ヒト重鎖)]。しかしながら、そのような実験の結果は変動的であり、場合によって、トランスジェンの不完全なまたは最小の再配列を生じることがある。

上記に基づくと、ヒト以外の種から誘導された異種モノクローナル抗体、例えばヒト起源の抗体に対する要求が存在することは明らかである。よって、モノクローナル抗体がそれらのために設計される特定の種において療法的に利用することができるモノクローナル抗体の源を提供することが本発明の目的である。

上記目的に従って、異種抗体、例えばヒト抗体、を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物が提供される。

更に、異種抗体を発現することができるそのようなトランスジェニック動物からのB細胞であって、特定抗原に特異的なモノクローナル抗体の源を提供するために不活化されている前記B細胞を提供することが本発明の目的である。

この上記目的に従って、そのような異種モノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を提供することが本発明の更なる目的である。

更にまた、上述の非ヒトトランスジェニック動物の製造に有用な再配列されていないおよび再配列された異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンを提供することが本発明の目的である。

更にまた、トランスジェニック動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子鎖を破壊する方法を提供することが本発明の目的である。

更にまた、上述のトランスジェニック非ヒト動物において異種抗体産生を誘導する方法を提供することが本発明の目的である。

本発明の更なる目的は、本発明の1または複数のトランスジェンを作製するために使われる免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントレパートリーを作製する方法を提供することである。

上記の参考文献は、単に本出願の出願日より前のそれらの開示のために提供される。本発明者らが先行発明によってそのような開示より早い日付けの権利がないと認めることと解釈してはならない。

発明の要約

上記目的に従って、本発明の一観点では、トランスジェニック動物の生殖細胞 (ジャームライン) 中に再配列された、再配列されていない、または再配列されたものと再配列されていないものとの組み合わせの、異種免疫

グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンを含有する、トランスジェニック非ヒト動物が提供される。

異種重鎖および/または軽鎖の再配列されていない免疫グロブリントランスジェンは、宿主非ヒト動物に導入されると、重鎖および軽鎖異種免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニック非ヒト動物、または一方もしくは他方のトランスジェンを含有する中間動物を生ぜしめる。そのような中間動物の生殖細胞中に組み込まれると、重鎖トランスジェンを含むものと軽鎖トランスジェンを含むものとの間での異種交配が、重鎖と軽鎖の両方の異種免疫グロブリントランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物をもたらす。

本発明のトランスジェンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る重鎖トランスジェンを包含する。免疫グロブリン軽鎖トランスジェンは、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。軽鎖および重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、それらが、またはトランスジェニック非ヒト動物から成らない種からの免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAに由来する又は対応するという点で、トランスジェニック非ヒト動物にとって異種である。本発明の一観点によれば、個々の遺伝子セグメントが再配列されておらず、即ち機能的な免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードするように再配列されていないようなトランスジェンが作製される。そのような再配列されていないトランスジェンは、抗原に暴露すると、トランスジェニック非ヒト動物において該遺伝子セグメントの組換え（機能的再配列）および生成した再配列された免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖の体細胞突然変異を可能にする。

本発明の別の観点によれば、異種重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンは、再配列された異種DNAの比較的大きい断片を含んで成る。そのような断片は、典型的には異種免疫グロブリン遺伝子座からのC、J（および重鎖の場合にはD）セグメントの実質的部分を含む。加えて、そのような断片は可変遺伝子セグメントの実質的部分も含んで成る。

別の態様では、HP LaserJet Series IIHPLASEII. PR Segmentsである。そのようなトランスジェン構成物では、様々は調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー、クラススイッチ領域、組換えシグナル等、異種DNAから誘導された対応配列を含んで成る。あるいは、そのような調節配列を、本発明に使われる非ヒト動物と同一のまたは関連の種からのトランスジェン中に組み込むことができる。例えば、トランスジェニックマウスに使うために、齧歯類免疫グロブリンエンハンサー配列を有するトランスジェン中にヒト免疫グロブリン遺伝子セグメ

ントを組み合わせることができる。

本発明の方法では、生殖細胞再配列されていない軽鎖および重鎖免疫グロブリントランスジェン—即ちB細胞分化中にVDJ結合を受けるものを抗原と接触せしめ、二次レパトリーB細胞における異種抗体の産生を誘導する。そのような誘導は、一次レパトリーB細胞中に含まれる再配列された重鎖および/または軽鎖トランスジェンにおいて体細胞突然変異を引き起こし、該抗原に対して高い親和性および特異性を有する異種抗体を産生する。

そのような抗体産生B細胞は、ウイルスを用いて、またはDNA構成物を含む癌遺伝子を用いて形質転換せしめることにより、あるいは、ミエローマ細胞系と融合させて抗体を分泌するハイブリドーマを形成せしめることにより、不死化することができる。各場合、特定抗原に対して十分な親和性および特異性を有するクローンを選択し、該トランスジェンの免疫グロブリン遺伝子セグメントが誘導される種において低い免疫原性を有するモノクローナル抗体源を提供する。

本発明に使われる非ヒト動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子座を破壊するベクターおよび方法も本発明に包含される。そのようなベクターおよび方法は、トランスジェン、好ましくはポジティブ・ネガティブ（positive-negative）選別ベクターを使用し、該ベクターは、それが本発明において使用する非ヒト動物にとって内因性である重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンをコードする遺伝子セグメントのクラスの機能的破壊を標的するように構成される。そのような内因性遺伝子セグメントとしては、多様性領域、連結領域および定常領域遺伝子セグメントが挙げられる。本発明のこの観点によれば、ポジティブ・ネガティブ選別ベクターを少なくとも1つの非ヒト動物の胚性幹細胞と接触させた後、ポジティブ・ネガティブ選別ベクターが相同組換えによって非ヒト動物のゲノム中に組み込まれている細胞を選択する。移植後、得られたトランスジェニック非ヒト動物は、該ベクターの相同組み込みの結果として、免疫グロブリン媒介の免疫応答を開始することが実質的に不可能である。そのような免疫不全非ヒト動物は、その後、免疫不全症の研究に使うことができ、または異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンの受容体として使うことができる。

本発明はまた、本発明のトランスジェンに使うことができる合成可変領域遺伝子セグメントを作製する方法を包含する。該方法は、免疫グロブリンVセグメントDNAの集団を作製することを含んで成り、ここで各々のVセグメントDNAは免疫グロブリンVセグメントをコードしそして各末端に制限エンドヌクレアーゼの開裂認識部位を含む。その後、免疫グロブリンVセグメントDNAの集団を鎖状に連結して合成免疫グロブリンVセグメントレパートリーを形成せしめる。

本発明の別の観点は、トランスジェニック動物の生殖細胞中に機能的に再配列された異種重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物に関する。そのような動物は、上述の再配列された重鎖および軽鎖トランスジェンを発現する一次レパトリーB細胞を含有する。そのようなB細胞は、抗原と接触すると体細胞突然変異を受けて、該抗原に対して高い親和性および特異性を有する異種抗体を形成することができる。

本発明はまた、重鎖および軽鎖トランスジェンを有する生殖細胞を含有するトランスジェニック動物であって、前記トランスジェンの一方が配列された遺伝子セグメントを含み、他方が再配列されていない遺伝子セグメントを含む、トランスジェニック動物にも関する。

本発明は、再配列された重鎖および軽鎖異種免疫グロブリントランスジェンを有する一次レパトリーB細胞を含有するトランスジェニック動物中で異種抗体を産生せしめる方法にも関する。そのようなトランスジェニック動物は、上述したトランスジェニック動物のいずれかから得ることができる。該動物の生殖細胞中に再配列されない重鎖および軽鎖トランスジェンを含むトランスジェニック動物、再配列された重鎖および軽鎖トランスジェンを含有するトランスジェニック動物、または1つが再配列されたトランスジェンそしてもう1つが再配列されていないトランスジェンを含有する動物は、各々、再配列された異種重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンを有する一次レパトリーB細胞を含有する。本発明の方法では、第一抗原を結合することができる所望の異種第一抗体が産生される。そのような動物の一次レパトリーB細胞中の再配列された免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンは、第二の既知抗原に対して十分な親和性を有する一次レパトリー抗体を産生することが知られている。この方法では、トランスジェニック非ヒト動物を連続的にまたは同時に第一および第二抗原と接触せしめ、再配列されたトランスジェンの体細胞突然変異により第一異種抗体の産生を誘導する。次いでこうして産生された二次レパトリーB細胞を上述の如く操作して、第一抗原を結合することができる所望のモノクローナル抗体の産生を不死化する。

本発明は、複製開始点 (ORI)、転写調節領域 (例えばROP、またはpACYC177の転写調節配列、または当業界で既知の他の配列) およびクローニング部位を有する、大型のDNA断片 (例えば免疫グロブリンゲノム断片) のクローニングに有用であるプラスミドにも関する。該プラスミドは更に、内因性プラスミド由来プロモーターの下流、例えばアンピシリン耐性遺伝子 (amp^R) の下流に、転写ターミネーター (例えば trpR または当業界で既知の他の配列) も含む。転写ターミネーターは、プロモーターの所で始まる転写クローニング部位の上流で終結するようにクローニング部位の上流に置かれる。好

ましい態様では、クローニング部位は稀少な制限部位により隣接され、該制限部位は、より一般的な制限部位を作っている6以下のヌクレオチドの代わりに、7,8または以上のヌクレオチドから成る部位であり、例えばNot I, Sfi IおよびPac Iである。稀少な制限部位としては、天然のDNA配列中では稀に存在する、即ち8,000~10,000ヌクレオチド毎に約1回よりも低い頻度で存在するヌクレオチド配列を含む部位も挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は、再配列されていないゲノムDNA中および再配列された免疫グロブリン重鎖遺伝子から発現されるmRNA中の相補性決定領域CDR1, CDR2およびCDR3、並びにフレームワーク領域FR1, FR2, FR3およびFR4を表す。

図2はヒト λ 鎖遺伝子座を表す。

図3はヒト κ 鎖遺伝子座を表す。

図4はヒト重鎖遺伝子座を表す。

図5および6は、合成Vセグメントレパトリーを作製するための方策を示す。

図7は、内因性免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊のための方策を示す。

図8は、B細胞の成熟を導くT細胞媒介二次応答を示す。

図9は、2つの異なる抗原に应答したB細胞の体細胞突然変異およびクローン増殖を示す。

図10は、ヒト $\gamma 3$ および $\gamma 1$ 定常領域を含む25kb断片とその後方のラット鎖3'エンハンサー配列を含む700bp断片に連結された再配列されたIgM遺伝子を含有するトランスジェン構成物を示す。

図11は、生体内相同組換えによって軽鎖トランスジェンを形成するために使うことができる断片を表す、ヒト κ 鎖遺伝子座の制限地図である。

図12はpGP1の作製を示す。

図13はpGP1中に含まれるポリリンカーの構成を示す。

図14は、本発明のヒト重鎖トランスジェンを作製するのに使う断片を示す。

図15は、pHIG1およびpCON1の作製を示す。

図16は、pREG2を形成せしめるためにpRE3 (ラットエンハンサー3') 中に挿入されるヒト $\gamma 1$ 断片を示す。

図17はpHIG3' およびpCONの作製を示す。

図18は、本発明のトランスジェンの作製に使われるヒトD領域セグメントを含む断片を示す。

図19は、pHIG2 (Dセグメント含有プラスミド) の作製を示す。

図20は、本発明のトランスジェンの作製に使われるヒト λ およびヒト κ 遺伝子セグメントを包含する断片を示す。

図21はpE μ の構造を示す。

図22はpKaphの作製を示す。

図23A~23Dは、マウスの内因性免疫グロブリン重鎖遺

伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選別ベクターの作製を示す。

図24A~24Cは、マウスの内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を機能的に破壊するためのポジティブ・ネガティブ選別ベクターの作製を示す。

図25a~eは、 κ 鎖標的ベクターの構造を示す。

図26a~fは、マウス重鎖標的ベクターの構造を示す。

図27はベクターpGPeの地図を示す。

図28はベクターpJM2の構造を示す。

図29はベクターpCOR1の構造を示す。

図30はpIGM1, pHClおよびpHC2のトランスジェニック構成物を示す。

図31はp γ e2の構造を示す。

図32はpVGE1の構造を示す。

図33はpHClトランスジェニックマウス中でのヒトIg発現のアッセイ結果を示す。

図34はpJCK1の構造を示す。

図35は合成重鎖可変領域を作製を示す。

表1はベクターpGPeの配列を示す。

表2は遺伝子V μ 49.8の配列を示す。

本明細書においてヒト重鎖を有する異種免疫グロブリンとは、ヒト重鎖-ヒト軽鎖及びヒト重鎖-マウス軽鎖の両者を包含し、たとえば図33に示されているようなものである。

本明細書において用いられている語「ヒトDIR2遺伝子配列」は、Ichiharaら、1988, EMB J. 7, 4141-4150に記載されているヒトDIR2遺伝子セグメントと実質的に同一のヒトD遺伝子セグメントを言う。

また本明細書においてpHClは、明細書第92~100頁の実施例14のA~Cの方法により得られる。該pHClは、下記の配列要素の全部がNot Iでの消化によりベクター配列を含まない単一断片において単離しそしてマウス胚の前該中にマイクロインジェクションしてトランスジェニック動物を作成することができるように、ラット重鎖3'エンハンサーと共に、2つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのヒトDセグメント、6つのヒトJ μ セグメント全部、ヒトJ μ - μ エンハンサー、ヒト σ μ 要素、ヒト μ スイッチ領域、ヒト μ コードエクソン全部、ヒト Σ μ 要素、および γ 1定常領域（関連のスイッチ領域および不毛転写物関連エクソンを含む）を含有するものを言う。

「N領域ヌクレオチド」とは、V-D-J連結化のプロセスの間に、D遺伝子セグメントとJ遺伝子セグメントとの間及びV遺伝子セグメントとD遺伝子セグメントとの間に加えられたヌクレオチドを言う。

詳細な説明

異種抗体レパートリーによる外来抗原刺激に应答するトランスジェニック非ヒト動物のデザインは、トランスジェニック動物の内部の含まれた異種免疫グロブリン

ランスジェンがB細胞発達経路を通して正しく機能することを必要とする。従って、本発明の一観点では、下記のうちの1つまたは全部をもたらすようにトランスジェンが作製される：（1）高レベルで且つ細胞型特異的な発現、（2）機能的な遺伝子再配列、（3）対立遺伝子排除の活性化およびそれに対する応答、（4）十分な一次レパートリーの発現、（5）シグナル形質導入、

（6）クラススイッチ、（7）体細胞高度突然変異（hypermuation）、および（8）免疫応答の間のトランス

ジェン抗体遺伝子座の優性化。

下記開示から明らかなように、上記の基準の全てを満たす必要はない。例えば、トランスジェニック動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座が機能的に破壊されるそれらの態様では、トランスジェンは対立遺伝子排除を活性化する必要がない。更に、トランスジェンが機能的に再配列された重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含んで成る態様では、2番目の基準である機能的な遺伝子再配列は、少なくとも既に再配列されているトランスジェンには不要である。分子免疫学に関する背景については、Fundamental Immunology, 第2版(1989), Paul William E. 編, Raven Press, N.Y. を参照のこと。

抗体の構造および産生

抗体としても知られている免疫グロブリンは、全ての哺乳類の血清および組織液中に存在する糖タンパク質の一群である。それらは、前駆体Bリンパ球（本明細書中で「一次レパートリーB細胞」とも呼称される）から発達する形質細胞（本明細書中で「二次レパートリーB細胞」とも呼称される）により多量に産生される。そのような一次レパートリーB細胞は、完全に分化した二次レパートリーB細胞によって産生されるものに類似している膜結合型免疫グロブリンを担持している。抗体形成の誘導には一次レパートリーB細胞と外来抗原との接触が必要である。

全ての免疫グロブリンの基本構造は、ジスルフィド結合によって一緒に連結された2つの同一の軽鎖ポリペプチドと2つの同一の重鎖ポリペプチドとから成る単位に基づく。各軽鎖は、可変軽鎖領域および定常軽鎖領域として知られる2つの領域を含んで成る。同様に、免疫グロブリン重鎖は、可変重鎖領域および定常重鎖領域と呼ばれる2つの領域を含んで成る。重鎖または軽鎖の定常領域は、重鎖または軽鎖定常領域遺伝子セグメントと呼ばれるゲノム配列によりコードされる。特定の重鎖遺伝子セグメントの使用が免疫グロブリンのクラスを限定する。例えば、ヒトでは、 μ 定常領域遺伝子セグメントが抗体のIgMクラスを限定し、一方で γ 1, γ 2, γ 3または γ 4定常領域遺伝子セグメントが抗体のIgGクラス並びにIgGのサブクラスIgG1~IgG4を限定する。

重鎖および軽鎖免疫グロブリンの可変領域は、一緒になって抗体の抗原結合領域を含む。広範囲の抗原を結合できるようにするために抗体のこの領域に多様性が必要

なため、初期または一次レパートリー可変領域をコードするDNAは、特定の可変領域遺伝子セグメントのファミリーに由来する多数の異なるDNAセグメントを含んで成る。軽鎖可変領域の場合、そのようなファミリーは可変(V)遺伝子セグメントと連結(J)遺伝子セグメントを含んで成る。よって、軽鎖の処理可変領域は1つのV遺伝子セグメントと1つのJ遺伝子セグメントによってコードされ、各セグメントはその生物のゲノムDNA中に含まれるVおよびJ遺伝子セグメントのファミリーから選ばれる。重鎖可変領域の場合、重鎖の初期または一次レパートリー可変領域をコードするDNAは、1つの重鎖V遺伝子セグメント、1つの重鎖多様性(D)遺伝子セグメントおよび1つのJ遺伝子セグメントを含んで成り、各セグメントはゲノムDNA中の適当な免疫グロブリン遺伝子セグメントのV、DおよびJファミリーから得られる。

一次レパートリー

重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子をコードするDNAを作製する方法は、主としてB細胞を発達させることに存する。種々の免疫グロブリン遺伝子セグメントの結合前、V、D、Jおよび定常(C)遺伝子セグメントは、大部分、一次レパートリーB細胞の前駆体中にV、D、JおよびC遺伝子セグメントのクラスター中で見つかる。通常、重鎖または軽鎖の遺伝子セグメントの全てが単一の染色体上に比較的近くに密接して置かれている。様々な免疫グロブリン遺伝子セグメントの組換え前のそのようなゲノムDNAは、本明細書中「再配列されていない」ゲノムDNAと呼称される。B細胞分化の間に、V、D、J(または軽鎖遺伝子の場合にはVとJのみ)の適当なファミリーメンバーのいずれか1つの遺伝子セグメントが組み換えられて機能的に再配列された重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子を形成する。そのような機能的再配列は、機能的な可変領域をコードするDNAを形成する可変領域セグメントの再配列である。この遺伝子セグメント再配列過程は連続的であると思われる。最初に、重鎖D-J結合点から作られ、次いで重鎖V-DJ結合点と軽鎖V-J結合点で作られる。軽鎖および/または重鎖中の機能的な可変領域のこの初期形態をコードするDNAは、「機能的に再配列されたDNA」または「再配列されたDNA」と呼ばれる。重鎖の場合、そのようなDNAは「再配列された重鎖DNA」と呼ばれ、そして軽鎖の場合、そのようなDNAは「再配列された軽鎖DNA」と呼ばれる。本発明のトランスジェンの機能的再配列を記述するためにも同様な用語が使われる。

機能的な重鎖および軽鎖可変領域を形成するための可変領域遺伝子セグメントの組換えは、組換え応答能のあるV、DおよびJセグメントに隣接する組換えシグナル配列(RSS)により媒介される。組換えを指令するのに必要且つ十分なRSSは、二つ組対称のヘプタマー、高AT/ナマー、および12塩基対または23塩基対のいずれかの中

断スペーサー領域を含んで成る。それらのシグナルは、D-J(またはV-J)組換えを行いそして機能的に相互交換可能である異なる遺伝子座および種の間で保存されている。Oettingerら(1990)、*Science*, 248, 1517-1523およびその中に引用された参考文献を参照のこと。配列CACAGTGまたはその類似体を含んで成るヘプタマーの後に非保存性配列のスペーサー、次いで配列ACAAAAACまたはその類似体を有するノナマーが存在する。それらの配列は、各VおよびD遺伝子セグメントのJ側、即ち下流側上に見つかる。生殖細胞型DおよびJ遺伝子セグメントの直前に、再び2つの組換えシグナル配列があり、すなわち最初にノナマーそして次に、非保存性配列により隔てられてヘプタマーがある。V_L、V_HまたはDセグメントの後ろのヘプタマーおよびノナマー配列は、それらが組み換わるJ_L、DまたはJ_Hセグメントの前方のものと相補的である。ヘプタマーとノナマー配列との間のスペーサーは12塩基対の長さかまたは22~24塩基対の長さかのいずれかである。

V、DおよびJセグメントの再配列に加えて、軽鎖のVセグメントとJセグメントとの間および重鎖のDセグメントとJセグメントとの間の可変的組換えによって、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の一次レパートリーにおいて更なる多様性が生まれる。そのような様々な組換えは、そのようなセグメントが結合する正確な場所の変更(ずれ)によって生成される。軽鎖におけるそのようなずれは、典型的にはV遺伝子セグメントの最後のコドンの内部およびJセグメントの最初のコドンの内部に起こる。同様な結合のずれは、重鎖染色体上ではDセグメントとJ_Hセグメントとの間に起こり、10ヌクレオチドほどの多数に及ぶことがある。更に、DセグメントとJ_Hセグメントとの間およびV_HセグメントとDセグメントとの間に、ゲノムDNAによりコードされない幾つかのヌクレオチドが挿入されることがある。それらのヌクレオチドの付加はN領域多様性として知られている。

VJおよび/またはVDJ再配列の後、再配列された可変領域遺伝子セグメントおよび再配列された可変領域の下流に置かれた1または複数の定常領域遺伝子セグメントの転写は、一次RNA転写物を生成し、これが適当なRNAスプライシングを受けると、全長の重鎖または軽鎖免疫グロブリンをコードするmRNAを生じる。そのような重鎖および軽鎖は、B細胞の経膜領域中への免疫グロブリンの挿入および/またはB細胞からの分泌を行うリーダー配列を含む。このシグナル配列をコードするDNAは、免疫グロブリン重鎖または軽鎖の可変領域を形成するのに使うVセグメントの第一エクソンの内部に含まれる。コードされる免疫グロブリン重鎖および軽鎖ポリペプチド(これは互いの適切な会合によって抗体分子を形成する)を生成するmRAMの翻訳を調節するためにmRNA中に適当な調節配列も存在する。

可変領域遺伝子セグメント中のそのような再配列およ

19

びそのような連結中に起こり得る可変的組換えの最終結果は、一次抗体レパートリーの生成である。一般に、この段階まで分化された各B細胞は、単一の一次レパートリー抗体を産生する。この分化過程の間に、機能的に再配列されたIg遺伝子内に含まれるもの以外の遺伝子セグメントの機能的再配列を抑制する細胞現象が起こる。二倍体B細胞がそのような単一特異性を維持する過程は、対立遺伝子排除と呼ばれる。

二次レパートリー

一次レパートリーを含んで成る配列の組の中からの免疫グロブリンを発現するB細胞クローンは、外来抗原に10 応答させるのにすぐに利用可能である。単純なVJおよびVDJ結合により生じる限定された多様性のため、いわゆる一次応答によって産生される抗体は比較的低い親和性のものである。2つの異なる型のB細胞がこの初期応答を作成する：一次抗体形成細胞の前駆体および二次レパートリーB細胞の前駆体 [Lintonら (1989, *Cell*, 59, 1049-1059)]。最初の型のB細胞は或る種の抗原に10 応答してIgM分泌性形質細胞に成熟する。他方のB細胞は、T細胞依存性成熟過程に入るにより、抗原への初期暴露20 に応答する。このT細胞依存性B細胞成熟の最中に、体細胞突然変異と呼ばれる過程（しばしば高次突然変異とも呼ばれる）によって第二水準の多様性が作られる。それらの一次レパートリーB細胞は、それらの表面上の免疫グロブリン分子を使って外来抗原を結合し細胞内に取り込む。外来抗原がタンパク質であるかまたは別のタンパク質抗原に物理的に結合されるならば、そのタンパク質抗原は処理されそして主要組織適合性複合体 (MHC) 分子により細胞表面でヘルパーT細胞に提示され、後者が次いでB細胞の成熟を誘導する。Lanzavecchia (1985), *Nature*, 314, 537. このB細胞の完全成熟は二次応答として知られている。30

抗原により感作されたB細胞クローンのT細胞依存性成熟の間に、細胞表面上の抗体分子の構造が2つの経路で変化する。第一は、定常領域が非IgMサブタイプにスイッチし、そして可変領域の配列が多数の単一アミノ酸置換に変更されて一層高い親和性の抗体分子を生成する。一層高い親和性のクローンを選択した後、Ig媒介免疫応答によって特徴付けられる非常に特異的に且つ強固に結合する免疫グロブリンを生産するのは、この体細胞40 突然変異の過程である。

前に指摘したように、Ig重鎖または軽鎖の各可変領域は、抗原結合領域を含む。二次応答の間の体細胞突然変異は、アミノ酸および核酸配列決定により、3つの相補性決定領域 (CDR1, CDR2およびCDR3; これは超可変領域1, 2または3とも呼ばれる) を含むV領域の至るところで起こることが決定されている。CDR1とCDR2は可変遺伝子セグメント内部に位置し、一方CDR3は大部分がV遺伝子セグメントとJ遺伝子セグメントの間またはV, DおよびJ遺伝子セグメントの間の組換えの結果である。CDR1, 2 50

20

または3を構成しない可変領域の部分は、一般に、FR1, FR2, FR3およびFR4と名付けられたフレームワーク領域と呼ばれる。図1を参照のこと。高度突然変異の間に、再配列されたDNAが変異されて異なるIg分子を有する新しいクローンを生じる。外来抗原に対して一層高い親和性を有するそれらのクローンがヘルパーT細胞によって選択的に増大されて、発現抗体の親和力成熟を引き起こす。クローン選択は、典型的にはCDR1, CDR2およびまたはCDR3領域中に新規変異を含むクローンの発現をもたらす。しかしながら、抗原結合領域の特異性および親和性に影響を及ぼすようなそれらの領域の外側の変異も起こる。

異種抗体を産生することができるトランスジェニック非ヒト動物

本発明の1観点では、トランスジェニック非ヒト動物は、少なくとも1つの本発明の免疫グロブリントランスジェン（後述）を非ヒト動物の接合子または初期胚中に導入することにより製造される。本発明に有用である非ヒト動物は、一般に、免疫グロブリン遺伝子セグメントを再配列して一次抗体応答を生ぜしめることができ、そしてその上、そのような再配列されたIg遺伝子の体細胞突然変異によって二次応答を開始することができる、任意の哺乳類を包含する。特に好ましい非ヒト動物はマウスまたは齧歯類の他のメンバーである。マウスはそれらの免疫系（マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のゲノム構成を含む）が広範囲に渡り研究されているために特に有用である。例えばImmunoglobulin Genes, Academic Press, T. Honjo, F. W. AltおよびT. H. Rabbitts編 (1989) を参照のこと。

しかしながら、本発明はマウスの使用に限定されない。むしろ、一次および二次抗体応答を開始することができる任意の非ヒト哺乳動物を使うことができる。そのような動物としては、非ヒト霊長類、例えばチンパンジー、ウシ、ヒツジおよびブタの種、齧歯類の他のメンバー、例えばラット、並びにウサギおよびモルモットが挙げられる。特に好ましい動物はマウス、ラット、ウサギおよびモルモットであり、最も好ましくはマウスである。

本明細書中で使用する時、用語「抗体」は、ジスルフィド結合により一緒に連結された2つの同一の軽ポリペプチド鎖と2つの同一の重ポリペプチド鎖を少なくとも含んで成る糖タンパク質を言う。重および軽ポリペプチド鎖は各々、抗原と相互作用する結合ドメインを含む可変領域（通常はポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含50 有する。重および軽ポリペプチド鎖は各々、ポリペプチド鎖の定常領域（通常はカルボキシ末端部分）も含んでおり、その配列の一部は、免疫系の種々の細胞、或る種の食細胞および典型的補体系の第一成分 (C1q) を含む宿主組織への免疫グロブリンの結合を媒介する。

本明細書中で使用する時、「異種抗体」は、そのよう

な抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義される。それは、トランスジェニック非ヒト動物から成らない生物において見つかるものに対応するアミノ酸配列を有するかまたはDNA配列をコードする抗体である。よって、様々な重鎖または軽鎖遺伝子セグメントを含むトランスジェニックの再配列前に、例えばハイブリダイゼーションまたはDNA配列決定により、そのような遺伝子セグメントを容易に同定することができる。例えば、本発明の一態様では、ヒトゲノム由来の様々な遺伝子セグメントが再配列されていない形で重鎖および軽鎖トランスジェニックに使われる。この態様では、そのようなトランスジェニックがマウスに導入される。軽鎖および/または重鎖トランスジェニックの再配列されていない遺伝子セグメントは、マウスゲノム中の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントと識別可能である、ヒト種に固有のDNA配列を有する。それらは生殖細胞やB細胞から成らない体細胞では再配列されていない形態でそしてB細胞では再配列された形態で容易に検出することができる。

本発明の別の態様では、トランスジェニックは、再配列された重鎖および/または軽鎖免疫グロブリントランスジェニックを含んで成る。そのようなトランスジェニックの機能的に再配列されたVDJまたはVJセグメントに相当する特定セグメントは、マウス中の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントから明らかに識別可能である免疫グロブリンDNA配列を含む。

そういったDNA配列の相違は、マウスB配列によりコードされるアミノ酸配列に比較するとそのようなヒト免疫グロブリントランスジェニックによりコードされるアミノ酸配列にも反映される。よって、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされる免疫グロブリンエピトープに特異的な抗体を使って、本発明のトランスジェニック非ヒト動物において、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を検出することができる。

ヒトまたは他の種由来の再配列されていないトランスジェニックを含有するトランスジェニックB細胞は、適当な遺伝子セグメントを機能的に組換えると、機能的に再配列された軽鎖および重鎖可変領域を形成する。そのような再配列されたトランスジェニックのDNAは、大部分が、前記再配列されたトランスジェニックを得た遺伝子セグメントのDNA配列と正確には一致しないであろうと理解すべきである。これは主に、可変的組換えの間に導入される変形のためであり、そして二次応答中の高度突然変異により導入される突然変異のためである。DNA配列中（並びにアミノ酸配列中）のそのような変形にもかかわらず、前記再配列されたトランスジェニックによりコードされる抗体は、本発明を実施するのに用いる非ヒト動物中で通常遭遇するものとは異種であるDNAおよび/またはアミノ酸配列を有することは容易に明らかであろう。

用語「実質的に同じ」は、ポリペプチドに対して言及する時、問題のポリペプチドまたはタンパク質が、天然

のタンパク質全部またはその部分と少なくとも約30%の一致、通常は少なくとも約70%の一致、好ましくは少なくとも約95%の一致を示すことを指摘する。本明細書中で使用する時、用語「単離された」、「実質的に純粋な」および「実質的に均質な」は、本明細書中で相互に交換可能に用いられ、そして本来それに付随する成分から分離されているポリペプチドタンパク質を言う。典型的には、単量体タンパク質は、試料の少なくとも約60~75%が単一のポリペプチド骨格を示す時に実質的に純粋である。微量の変形または化学的収束は典型的に同じポリペプチド配列を共有する。実質的に純粋なタンパク質は、典型的にはタンパク質試料の約85~90%以上、より普通には約95%を含んで成り、好ましくは約99%以上の純度であろう。タンパク質純度または均質性は、当業界で公知である多数の手段により、例えばタンパク質試料をポリアクリルアミド電気泳動した後、染色によってポリアクリルアミドゲル上の単一ポリペプチドバンドを視覚化することにより、指摘することができる。ある目的では、高分解能が必要であり、HPLCまたは類似の手段が使われるだろう。ポリペプチドは、天然状態では該ポリペプチドに付随している生来の汚染物から分離された時、天然に伴う成分を実質的に含まない。よって、ポリペプチドが天然に由来する細胞とは異なる細胞系中で合成されたポリペプチドは、その天然に伴う成分を実質的に含まないだろう。

再配列されていないトランスジェニック

本明細書中で使用する時、「再配列されていない免疫グロブリン重鎖トランスジェニック」は、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの多様性遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。前記重鎖トランスジェニックの各遺伝子セグメントは、前記トランスジェニックが導入される非ヒト動物から成らない種の免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントをコードするDNAから誘導されるか、またはそれに相当する配列を有する。同様に、本明細書中で使用する時、「再配列されていない免疫グロブリン軽鎖トランスジェニック」は、少なくとも1つの可変遺伝子セグメント、1つの連結遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含んで成る。ここで、前記軽鎖トランスジェニックの各遺伝子セグメントは、前記軽鎖トランスジェニックが導入される非ヒト動物から成らない種の免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAから誘導されるか、またはそれに相当する配列を有する。

本発明のこの観点でのそのような重鎖および軽鎖トランスジェニックは、再配列されていない形態で上述の遺伝子セグメントを含有する。即ち、重鎖トランスジェニック中のV、DおよびJセグメントの間および軽鎖トランスジェニック中のVとJセグメントの間には、適当な組換えシグナル配列（RSS）が置かれる。加えて、そのようなトランス

ジェンは、定常領域遺伝子セグメントをVJまたはVDJ再配列された可変領域と結合するための適当なRNAスプライシングシグナルも含む。

重鎖トランスジェンが複数のC領域遺伝子セグメント、例えばヒトゲノムからのC μ およびC γ 1を含む限りでは、各定常領域遺伝子セグメントの上流で且つ可変領域遺伝子セグメントの下流に、免疫グロブリンクラススイッチ、例えばIgMからIgGへのクラススイッチを考慮した前記定常領域間の組換えを可能にするため、下記に説明するような「スイッチ」領域が組み込まれる。そのような重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェン

は、可変領域遺伝子セグメントの上流に置かれたプロモーター領域を含む転写調節配列 (OCTAおよびTATAモチーフを含む) も含有する。プロモーターに加えて、主にB系列細胞中で機能する他の調節配列が使われる。例えば、軽鎖トランスジェン上の好ましくはJセグメントと定常領域遺伝子セグメントとの間に置かれた軽鎖エンハンサー配列は、トランスジェンの発現を増強し、それによって対立遺伝子排除を促進するために使われる。重鎖トランスジェンの場合、調節エンハンサーも使われる。

上述のプロモーターおよびエンハンサー調節配列は包括的に記載されているけれども、そのような調節配列は非ヒト動物に対して異種であることができ、異種トランスジェン免疫グロブリン遺伝子セグメントが得られるゲノムDNAから誘導することができる。あるいは、そのような調節遺伝子セグメントは、重鎖および軽鎖トランスジェンを含む、非ヒト動物または密接に関連した種のゲノム中の対応する調節配列から誘導される。そのような調節配列は、トランスジェンの転写および翻訳を最大にし、その結果対立遺伝子排除を誘導しそして比較的高いレベルのトランスジェン発現を提供するために用いられる。

好ましい態様では、重鎖および軽鎖Igトランスジェン上に含まれる各免疫グロブリン遺伝子セグメントは、該トランスジェンを導入する予定の非ヒト動物に対して異種である種または個体のゲノムDNA、cDNAもしくはその部分から誘導されるか、またはそれに対応する配列を有する。結果として、そのような遺伝子セグメントがトランスジェニック非ヒト動物において機能的に再配列されてそして高次突然変異された時、そのような重鎖および軽鎖トランスジェンによりコードされる異種抗体は、Ig遺伝子セグメントが由来する生物において療法的に利用すると所望の抗原に対する特異的な効能を提供する、アミノ酸配列並びに総体的な二次および三次構造を有するであろう。その上、そのような抗体は、処置される生物に対して「外来」である抗体に比較して、実質的に減少された免疫原性を示す。

例えば、好ましい態様では、遺伝子セグメントはヒトから誘導される。そのような重鎖および軽鎖トランスジ

ェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物は、そのような動物に投与される特異抗原に対してIg媒介免疫応答を開始することができる。そのような動物中では異種ヒト抗体を産生することのできるB細胞が産生される。不死化後、および適当なモノクローナル抗体 (Mab)、例えばハイブリドーマの選択後、治療用ヒトモノクローナル抗体の源が提供される。そういったヒトMabは、ヒトに療法的に投与した時に実質的に減少された免疫原性を有する。

ヒト免疫グロブリントランスジェンを含む本発明のトランスジェニック動物において異種抗体を惹起せしめるのに使うことができる抗原の例としては、細菌、ウイルスおよび腫瘍抗原、並びに移植拒絶反応または自己免疫に関係がある特定のヒトB細胞およびT細胞抗原が挙げられる。

好ましい態様はヒト遺伝子セグメントを含む重鎖および軽鎖トランスジェンの作製を開示するけれども、本発明はそれに限定されない。この点に関しては、本明細書中に記載される教示は、ヒト以外の種からの免疫グロブリン遺伝子セグメントの使用に合わせて容易に改変できると理解すべきである。例えば、本発明の抗体によるヒトの治療処置に加えて、適当な遺伝子セグメントによりコードされる治療抗体を使って、獣医学に用いられるモノクローナル抗体を産生することができる。例えば、種関連モノクローナル抗体による家畜の処置も本発明により期待される。そのような抗体は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ等の種からの免疫グロブリン遺伝子セグメントを含むトランスジェンを使うことによって、同様に産生せしめることができる。

30 クラススイッチ

μ または δ 定常領域の使用は、大部分は、IgMおよびIgDを単一細胞中で同時発現できるようにする。交互スプライシングによって決定される。その他の重鎖イソタイプ (γ , α および ϵ) は、遺伝子再配列現象がC μ およびC δ エクソンを欠失させた後でのみ天然に発現される。この遺伝子再配列過程はクラススイッチと呼ばれ、各重鎖遺伝子 (δ を除く) のすぐ上流に置かれたいわゆるスイッチセグメントの間での組換えによって起こる。個々のスイッチセグメントは長さが2~10kbであり、主として短い反復配列から成る。組換えの正確な位置は個々のクラススイッチ現象ごとに異なる。

B細胞の成熟の間にトランスジェンがイソタイプをスイッチできることは、トランスジェニックマウス中で直接試験されたことはない。しかしながら、トランスジェンこの機能を成し遂げるだろう。Durdikら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2346-2350は、再配列されたマウス μ 重鎖遺伝子構成物をマイクロインジェクトすると、4つの独立したマウス系列において、高比率のトランスジェニックB細胞がIgMよりもむしろIgGに関係するトランスジェンによりコードされる可変領域を発現する

ことを見出した。トランスジェンと別の染色体上の内因性 γ 定常領域との間でイソタイプスイッチが起こったらしい。

本明細書中で使用する時、用語「スイッチ配列」は、スイッチ組換えを招くそれらのDNA配列を言う。「スイッチ供与体」配列、典型的には μ スイッチ領域は、スイッチ組換え中に欠失されるであろう定常領域の5'（即ち上流）にあるだろう。「スイッチ受容体」領域は、欠失されるであろう定常領域と代替定常領域（例えば γ 、 ϵ 等）との間であろう。組換えが常に起こる特異部位は1つもないので、典型的には最終遺伝子配列は構成物から予想不可能であろう。

μ 遺伝子のスイッチ（S）領域、 S_{μ} は、コード配列の約1~2kb5'側に位置し、そして（GAGCT）_n（GGGGT）の形の配列の多数の縦列反復から成る。ここでnは通常2~5であるが、17ほどの大きさに及ぶことができる。（T.Nikaidoら（1981）：*Nature*, 292:845-848を参照のこと。）

他のC_H遺伝子の5'にも、数千塩基対に及び同様な内部反復性スイッチ配列が見つかった。S α 領域は配列決定されており、縦列に反復した80bpの相同性単位から成ることが判明した。一方、S γ_{2a} 、S γ_{2b} およびS γ_3 は全て、互いに非常に類似している反復した49bpの相同性単位を含む。（P.Szurekら（1985）, *J. Immunol.*, 135:620-626およびT.Nikaidoら（1982）, *J. Biol. Chem.*, 257:7322-7329を参照のこと。）全ての配列決定されたS領域は、 S_{μ} 遺伝子の基本的反復配列であるペンタマーGAGCTおよびGGGGTの多数の発生を含む（T.Nikaidoら（1982）, *J. Biol. Chem.*, 257:7322-7329）；他のS領域では、それらのペンタマーは S_{μ} のように正確に縦列に反復されていないが代わりに大きな反復単位中に埋もれている。

S γ_3 領域は追加の高次構造を有し、即ち、2つの直接反復配列が49bpの縦列反復の2つのクラスターの各々に隣接する（M.R.Mowattら（1986）, *J. Immunol.*, 136:2674-2683を参照のこと）。ヒトH鎖遺伝子のスイッチ領域はそれらのマウス同族体に非常に類似していることがわかっている。一般に、V-J組換えの酵素機構とは異なり、スイッチ機構は、明らかに生殖細胞S前駆体の反復相同領域の種々の整列を収容することができ、次いで該配列を該配列内の異なる位置で連結することができる。（T.H.Rabbittsら（1981）*Nucleic Acids Res.*, 9:4509-4524およびJ.Ravetchら（1980）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:6734-6738を参照のこと。）

クラススイッチの誘導は、スイッチセグメントの上流で始まる不毛転写物（sterile transcript）に関係があるらしい（Lutzekenら（1988）*Mol. Cell Biol.*, 8:1849; Stavnezerら（1988）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7704; EsserおよびRadbruch（1989）*EMBO J.*, 8:483; Bertonら（1989）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2829; Rothman

ら（1990）*Int. Immunol.*, 2:612）。例えば、観察されるIL-4による $\gamma 1$ 不毛転写物の誘導およびIFN- γ による阻害は、IL-4がB細胞中での $\gamma 1$ へのクラススイッチを促進し、IFN- γ が $\gamma 1$ 発現を阻害するという観察結果と一致する。理論的には、クラススイッチを受けさせるようとするトランスジェン構成物は、それらの不毛転写物を調節するのに必要なシス作用性配列の全てを含むべきである。トランスジェニックマウスにおいてクラススイッチ（ $\sigma\mu$ および $\epsilon\mu$ ）を獲得する別法は、ヒト μ 遺伝子に隣接する400bpの直接反復配列の包含である（Yasuiら（1989）*Eur. J. Immunol.*, 19:1399）。それらの2配列間の相同組換えは、IgDのみのB細胞において μ 遺伝子を削除する。

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は当業者に公知である種々の技術により得ることができる。簡単に言えば、所望の抗原により免疫処置された動物の脾細胞を、通常はミエローマ細胞との融合により、不死化せしめる（KohlおよびMills tein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519（1976））。不死化の別法としては、エプスタインバーウイルス、癌遺伝子もしくはレトロウイルスによる形質転換、または当業界において公知である別の方法が挙げられる。単一の不死化細胞から生じたコロニーを、抗原に対する所望の特異性および親和性を有する抗体の産生についてスクリーニングし、そして脊椎動物宿主の腹腔中への注入を含む様々な技術によって、そのような細胞により産生されるモノクローナル抗体の収量を増大させることができる。それらの技術に有用である様々な方法は、例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York（1988）中に記載されており、免疫グロブリンを産生するための動物の免疫処置；モノクローナル抗体の産生；プローブとして使われる免疫グロブリンの標識；免疫アフィニティー精製；およびイムノアッセイを包含する。

トランスジェニック一次レパートリー

A. ヒト免疫グロブリン遺伝子座

トランスジェン機能のための重要な必要条件は、広範囲の抗原に対して二次免疫応答を開始させるのに十分な程度に多様である一次抗体レパートリーの作製である。種々の重鎖および軽鎖遺伝子セグメントをコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座のサイズは非常に大きい。例えば、ヒトゲノムでは、 λ 軽鎖遺伝子座、 κ 軽鎖遺伝子座および重鎖遺伝子座の3つの別々の遺伝子座は、合わせるとDNAの5Mb以上または全ゲノムのほぼ0.2%を占める。各遺伝子座は、B細胞発達の間に連結領域セグメント（および、重鎖遺伝子座では多様性領域セグメント）と組換わって完全なV領域エクソンを形成する複数の可変セグメントから成る。そのような再配列された軽鎖遺伝子は3つのエクソン：シグナルペプチドエクソン、可変領域エクソンおよび定常領域エクソンから成る。再配

列された重鎖遺伝子は幾分複雑である。それなシグナルペプチドエクソン、可変領域エクソン、および各々が数個のエクソンによりコードされる多ドメイン定常領域の縦列整列領域から成る。定常領域遺伝子の各々は異なる免疫グロブリンクラスの定常部分をコードする。B細胞発達の間に、V領域に近い定常領域が欠失されて新規重鎖クラスの発現をもたらす。各重鎖クラスについては、RNAスプライシングの択一的パターンが経膜型と分泌型の両方の免疫グロブリンをもたらす。

ヒト血清抗体分子の約40%が λ 軽鎖を含む。この遺伝子座（染色体22に位置決定される）の構造は、最も特徴づけられていないものである（図2）。それは、各々が単一のJセグメントに結合している6つの定常領域遺伝子の縦列配列の上流の未知数のVセグメントから成る。加えて、結合したJセグメントを有する更に2つの定常領域セグメントが単離されているが、 λ クラスターの残部とのそれらの結合は確立されておらず、それらが使われるかどうかわかっていない。E. Selsingら、"Immunoglobulin Genes", Academic Press, T. Honjo, F. W. AltおよびT. H. Rabbitts編（1989）。

κ 軽鎖遺伝子座は、染色体2上の3つのクラスター上に広がっている（図3）。それぞれ850kbおよび250kbにわたる最初の2つのクラスターは可変領域遺伝子セグメントのみを含む。約1Mbにわたる三番目のクラスターは約40個のV遺伝子セグメントを含み、その下流に5つのJセグメントのクラスターがあり、次いで単一の定常領域遺伝子セグメントがある。合計84個のV遺伝子セグメント同定されており、そしてそのほぼ半分が偽遺伝子であると考えられる [Zachau (1989) Immunoglobulin Genes, Academic Press, T. Honjo, F. W. AltおよびT. H. Rabbitts編, 91-110中]。C κ 領域の約25kb下流に「 κ 欠失要素 (κ de)」がある。この κ de配列は上流配列と組み換わって、 λ 軽鎖発現B細胞において κ 定常領域の欠失を引き起こす。これは、 κ と λ 遺伝子の両方を上手く再配列する細胞においてイソタイプ排除を引き起こす。

ヒト重鎖遺伝子座は最大であり且つ最も多様である。それは2Mbにわたる約200個のV遺伝子セグメント、約40kbにわたる約30個のD遺伝子セグメント、3kbの範囲内に密集した6個のセグメント、および約300kbにわたる9個の定常領域遺伝子セグメントから成る。全遺伝子座は、染色体14の長い方の腕の遠位部分約2.5Mbに及ぶ

（図4）。重鎖Vセグメントは配列類似性に基づいて6つのファミリーに分類することができる。約60のV_H1ファミリー、30のV_H2セグメント、80のV_H3セグメント、30のV_H4セグメント、3つのV_H5セグメントおよび1つのV_H6セグメントがある。Berman, J. E. ら（1988）, *EMBO J.*, **7**, 727-738。ヒト重鎖遺伝子座では、関連するVセグメントが密集しているマウス遺伝子座とは異なり、個々のVファミリーのメンバーが入り交じっている。VH6ファミリーの単一メンバーがVセグメントの最も近位にあ

り、定常領域遺伝子セグメントの90kb以内にマッピングされる。Sato, T. ら（1988）, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 265-271。機能的DおよびJセグメントは全て、この90kb領域のなかにあると思われる [Siebenlist ら（1981）, *Nature*, **294**, 631-635; Matsuda ら（1988）, *EMBO J.*, **7**, 1047-1051; Buluwela ら（1988）, *EMBO J.*, **7**, 2003-2010; Ichihara ら（1988）, *EMBO J.*, **7**, 4141-4150; Berman ら（1988）, *EMBO J.*, **7**, 727-738]。

10 B. 遺伝子断片トランスジェン

1. 重鎖トランスジェン

好ましい態様では、免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンは、ヒト由来の再配列されていないゲノムDNAを含んで成る。重鎖の場合、好ましいトランスジェンは670-830kbの長さを有するNot I断片を含んで成る。この断片の長さは、3'制限部位が正確にマッピングされていないため、不明瞭である。しかしながら、 α 1と ϕ α 遺伝子セグメントとの間にあることが知られている（図4参照）。この断片は、6つの既知V_Hファミリーの全部のメンバー、DおよびJ遺伝子セグメント、並びに μ , δ , γ 3, γ 1および α 1定常領域を含む。Berman ら（1988）, *EMBO J.*, **7**, 727-738。このトランスジェンを含有するトランスジェニックマウス系は、B細胞の発達に必要なとされる重鎖クラスの全部を正しく発現し、そしてほとんどの抗原に対して二次応答を開始するのに十分な程多数の可変領域のレパートリーを発現する。

2. 軽鎖トランスジェン

ヒト軽鎖遺伝子座からの必要な遺伝子セグメントおよび調節配列を全て含有するゲノム断片を同様に作製することができる。そのような構成物は実施例に記載される。

C. 生体内組換えにより細胞内に作製されるトランスジェン

単一DNA断片上の重鎖遺伝子座の全部または一部分を単離する必要はない。例えば、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座からの670-830kb Not I断片は、トランスジェン作製 (transgenesis) の間の非ヒト動物の生体内で形成させることができる。そのような生体内トランスジェン作製は、2以上の重複するDNA断片を非ヒト動物の胚性核に導入することにより行われる。DNA断片の重複部分は、実質的に相同であるDNA配列を有する。胚性核内に含まれるレコンビナーゼに暴露されると、重複しているDNA断片が適切な方向において相同的に組み換わって670-830kbのNot I重鎖断片を形成する。

しかしながら、生体内トランスジェン作製は、そのサイズのために現存の技術による作製または操作が困難であるかまたは不可能である多数の免疫グロブリントランスジェンを形成せしめるのに使うことができると理解すべきである。例えば、生体内トランスジェン作製は、YACベクター [MurrayおよびSzostak (1983), *Nature*, **30**

5,189-193) により操作することができるDNA断片よりも大きい免疫グロブリントランスジェンを作製するのに有用である。そのような生体内トランスジェン作製は、トランスジェニック非ヒト動物から成らない種の実質的に完全な免疫グロブリン遺伝子座を非ヒト動物中に導入する場合にも使うことができる。幾つかの研究グループが、YACベクター中に50~200kbのDNA断片を含むライブラリーを好結果に作製しており [Burkeら (1987), *Science*, 236, 806-812; Traver (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5898-5902] そしてポリアミン縮合を使って200~約1000kbのサイズの範囲でYACライブラリーを製造している [McCormickら (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9991-9995] けれども、ヒト定常領域免疫グロブリン遺伝子座の、670-830kbより実質的に大きいNot I断片をカバーする複数の重複断片が、本明細書中に開示される方法によってより大きいトランスジェンを容易に製造できると予想される。

ゲノム免疫グロブリントランスジェンを形成させることに加えて、実施例に記載の如く「小遺伝子座」トランスジェンを形成させるのにも生体内相同組換えを使うことができる。

生体内トランスジェン作製を利用する好ましい態様では、各々の重複するDNA断片は、好ましくは第一のDNA断片の末端部分と第二のDNA断片の末端部分の間で重複する実質的に相同なDNA配列を有する。DNA断片のそのような重複部分は、好ましくは約500bp~約2000bp、最も好ましくは1.0kb~2.0kbを含む。生体内でトランスジェンを形成させるための重複DNA断片の相同組換えは、1990年8月29日にU. S. S. N. 07/574, 747のもとに出願された

「DNA断片の相同組換えによるDNAの細胞内生成 (Intracellular Generation of DNA by Homologous Recombination of DNA Fragments)」と題する一般譲渡されたU. S. 特許出願明細書に更に詳しく記載されている。

D. 小遺伝子座トランスジェン

本明細書中で使用する時、「免疫グロブリン小遺伝子座」なる用語は、通常は約150kb未満、典型的には約25~100kbのDNA配列であって、前記DNA配列が少なくとも1つの実質的不連続性 (例えば、相同ゲノムDNA配列に関して、通常は少なくとも約2~5kb、好ましくは10~25kbまたはそれ以上の欠失) を有するような、次のものを各々少なくとも1つ含むDNA配列を言う：機能的変

(V) 遺伝子セグメント、機能的連結 (J) 領域セグメント、機能的定常 (C) 領域遺伝子セグメント、および重複小遺伝子座の場合には、機能的多様性 (D) 領域セグメント。軽鎖小遺伝子座トランスジェンは、長さが少なくとも25kb、典型的には50~80kbであるだろう。重鎖トランスジェンは、単一の定常領域と不完全なスイッチ領域を有するものは少なくとも約30kbであるのに対して、スイッチ領域に作用可能に連結された2つの定常領域を有するものは典型的には約70~80kb、好ましくは少

なくとも約60kbの長さであろう。更に、小遺伝子座の個々の要素は好ましくは生殖細胞 (ジャームライン) 配置にあり、そして小遺伝子座の該要素により完全にコードされる多様な抗原特異性を有する機能的抗体分子を発現するように、トランスジェニック動物の前駆体B細胞において遺伝子再配列を受けることができる。

他の好ましい態様では、免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンはV, D, JおよびC遺伝子セグメントを各々1つまたは複数含んで成る。適当なタイプの遺伝子セグメントの少なくとも1つが小遺伝子座トランスジェンに組み込まれる。重鎖トランスジェンのCセグメントに関しては、トランスジェンが少なくとも1つの μ 遺伝子セグメントと、少なくとも1つの他の定常領域遺伝子セグメント、より好ましくは γ 遺伝子セグメント、最も好ましくは $\gamma 3$ または $\gamma 1$ 遺伝子セグメントとを含むことが好ましい。この優先性は、体細胞突然変異および分泌形の高親和性非IgM免疫グロブリンの産生に備えて、コードされる免疫グロブリンのIgM形とIgG形との間のクラススイッチを考慮したものである。他の定常領域遺伝子セグメントも使うことができ、例えばIgD, IgAおよびIgEの産生をコードするものである。

ヒトの重鎖J領域セグメントは、3kbのDNA長さにおいて密集した6個の機能的Jセグメントと3個の偽遺伝子を含んで成る。それが比較的小さいサイズであることとそれらのセグメントが μ 遺伝子および δ 遺伝子の5'部分と一緒に単一の23kb Sfi I/Spe I断片として単離できること [Sadoら (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154, 246-271] を仮定すれば、小遺伝子座構成物において全部のJ領域遺伝子セグメントを使うことが好ましい。更に、この断片は μ 遺伝子と δ 遺伝子の間の領域に広がるため、 μ 発現に必要とされるシス結合した3'調節要素の全部を含む可能性が大きい。更に、この断片は完全なJ領域を含むため、重鎖エンハンサーと μ スイッチ領域を含む [Millsら (1983), *Nature*, 306, 809; YancopoulosおよびAlt (1986) *Ann. Rev. Immunol.*, 4, 339-368]。それはVDJ結合を開始させて一次レパートリーB細胞を形成させる転写開始部位を含む [YancopoulosおよびAlt (1985) *Cell*, 40, 271-281]。あるいは、23kb Sfi I/Spe I断片の代わりに、D領域の一部を含む36kb BssH II/Spe I断片を使うことができる。そのような断片の使用は、効率的D-J結合を促進させる5'隣接配列の量を増加させる。

ヒトD領域は、縦列に結合した4または5個の相同な9kbの亜領域から成る [Siebenlistら (1981), *Nature*, 294, 631-635]。各亜領域は10個までの個々のDセグメントを含む。それらのセグメントの一部はマッピングされており、それを図4に示す。2つの異なる方策を使って小遺伝子座D領域を作製する。第一の方策は、1つまたは2つの反復D亜領域を含む短いDNAの連続鎖の中に置かれたそれらのDセグメントのみを使うものであ

る。候補となるのは、12個の個々のDセグメントを含む単一の15kb断片である。DNAのこの断片は2つの近接するEcoR I断片から成り、そして完全に配列決定されている [Ichiharaら (1988), *EMBO J.*, 7, 4141-4150]。12のDセグメントが一次レパートリーに十分であろう。しかしながら、D領域の分散された性質があるとすれば、別の方策は、幾つかの非近接D断片含有断片と一緒に連結して、より多数のセグメントを有する一層小型のDNA断片を作製することである。

重鎖小遺伝子座トランスジェンを作製するには、少なくとも1つ、好ましくは複数のV遺伝子セグメントが使われる。隣接配列と一緒に1つまたは2つの隣接配列されていないVセグメントを含む10~15kbのDNA断片を単離する。特徴付けられたヒトハイブリドーマ、例えば抗シトメガロウイルス抗体を産生するもの [Newkirkら (1988) *J. Clin. Invest.*, 81, 1511-1518] の転写V領域から決定されたユニーク5'配列から作製したプローブを使って、そのようなDNAを含むクローンを選択する。重鎖mRNAの5'非翻訳配列を使って、この抗体を作製したもとの生殖細胞型Vセグメントを単離するためのユニークなヌクレオチドプローブ (好ましくは長さが40ヌクレオチド) を作製する。既知抗原に対する抗体中に含まれることが知られているVセグメントを使うと、このVセグメントが機能的であることを保証するだけでなく、二次免疫応答におけるトランスジェン関与の分析も助ける。このVセグメントを上述したように小遺伝子座のD領域および定常領域断片と融合せしめて、小遺伝子座重鎖トランスジェンを作製する。

あるいは、YACライブラリーから、多数のV領域セグメントを含む大きな連続したDNA断片を単離する。様々な数のV領域セグメントを含む種々の大きさのDNA断片を、小遺伝子座トランスジェン構成物中でヒト抗体レパートリーを提供する能力について試験する。YACベクター [MurrayおよびSzostak (1983), *Nature*, 305, 189-193]、F因子ベースのプラスミド [O' Connerら (1989), *Science*, 244, 1307-1312] または上述の重鎖断片の組換えを使った生体内作製を用いて、幾つかの非近接のVセグメント含有断片から1つの大きな断片を構築することも可能である。あるいは、合成V領域レパートリー (後述) を使うこともできる。

小遺伝子座軽鎖トランスジェンは、ヒトλまたはκ免疫グロブリン遺伝子座から同様に作製することができる。κ軽鎖小遺伝子座の作製は、重鎖小遺伝子座の作製に非常に類似しているが、ただし、それはサイズがより小さく複雑性がより低いために、ずっと単純である。ヒトκ遺伝子座は1つだけの定常領域セグメントを有する。5'および3'エンハンサーと一緒にこのセグメント、並びに全部で5つの機能的Jセグメントを、単一の10kb DNA断片において単離することができる。この断片は、重鎖小遺伝子座について記載したように作製された

小遺伝子座V領域と一緒に同時注入される。

例えば、複数のDNA断片 (その少なくとも2つ、3つまたは4つの各々は、V領域配列、D領域配列、Jおよび定常領域配列、D及びJ及び定常領域配列、または定常領域配列のいずれかであり、ここで、各配列はヒト遺伝子配列に実質的に相同である) から、V, D, Jおよび定常領域配列をコードする、例えば約75kbの、免疫グロブリン重鎖小遺伝子座トランスジェン構成物を形成せしめることができる。好ましくは、前記配列は転写調節配列に作用可能に連結され、そして再配列を受けることができる。2以上の適当に置かれた定常領域配列 (例えばμおよびγ) およびスイッチ領域では、スイッチ組換えも起こる。複数のDNA断片から同様に形成された、ヒトDNAに実質的に相同であり且つ再配列を受けることができる典型的な軽鎖トランスジェン構成物は、V, Dおよび定常領域をコードする少なくとも2つ、3つまたは4つのDNA断片を含み、ここで各断片はV領域配列、Jおよび定常領域配列か、または定常領域配列のいずれかを含んで成るだろう。

20 E. 機能的V遺伝子セグメントの決定方法および合成Vセグメントレパートリーの作製方法

遺伝子セグメントの様々なファミリー、即ちV, D, JおよびC領域遺伝子セグメントのうち、V遺伝子セグメントの数は通常、D, JおよびC領域遺伝子セグメントそれぞれに対応する遺伝子セグメントの数を遙かに上回る。産生される抗体の約90%が単一のV遺伝子セグメントを使うウサギ系 [KnightおよびBecker (1990), *Cell*, 60, 963-970] への類推によれば、限定数のV領域遺伝子セグメント、1ほど少数のV領域遺伝子セグメント、を含む重鎖および軽鎖トランスジェンを製造することが可能である。従って、免疫グロブリン媒介性免疫応答を開始する時に、特定生物、例えばヒトにより、どのV領域遺伝子セグメントが使われるかを決定する方法をもつことが望ましい。このアプローチによれば、単一のV遺伝子セグメントは、JまたはDJ遺伝子セグメントと組み合わせると、一次レパートリーの生成に十分な多様性をCDR3に提供することができ、これは、体細胞突然変異を受けると、可変領域の至るところで、例えば高親和性抗体の産生のためにはCDR1およびCDR2において、更なる多様性を提供することができる。

本発明のこの観点では、免疫応答の間に生物体によりどのV遺伝子セグメントが使われるかを決定するための方法およびベクターが提供される。この方法は、B細胞のポリA⁺RNAから合成したcDNA中にどのVセグメントが見つかるかを決定することに基づく。そのような方法およびベクターを使って合成Vセグメントレパートリーの作製を容易にすることもできる。

重鎖Vセグメントを同定するためおよび合成Vセグメントレパートリーを作製するためこの方策の概要は、図5と6に描写される。該方策は、適当な変更を伴って、

軽鎖Vセグメントを同定するためにも同様に利用することができる。第一段階はクローニングベクターの作製である。好ましい出発材料は、再配列されていないVセグメントと一緒に5'および3' 隣接配列を含有するDNA断片(約2kb)である。この断片を、プラスミド、例えば図5および6中で“w”および“z”と指定された稀少な切断性制限部位によって隣接されたポリリンカー部位を含むpGP1またはpGP2(後述)中にクローニングする(pGP1およびpGP2のポリリンカーと制限部位は実施例において説明する)。次いでオリゴヌクレオチド指令突然変異誘発を使って、2つの新規制限部位“x”および“y”(通常は各々約6ヌクレオチドの長さ)を導入する。制限部位“x”は、シグナルとVセグメントエクソンとの間のイントロンの3'末端から約20ヌクレオチドの所に置かれる。制限部位“y”は、ヘプタマーとノナマー組換えシグナル配列との間の23bpのスペーサーの内部に、Vセグメント結合点の約20ヌクレオチド3'側に置かれる。生じたプラスミドを酵素“x”および“y”で切断することにより、第二エクソン(Vセグメント)を除去し、5' 隣接配列、V領域プロモーター、シグナルペプチドエクソン、イントロン、“x”末端と“y”末端により隣接されたギャップ、組換えシグナル配列の外側半分、および3' 隣接配列を残す。このプラスミドをpVH1と命名する。

第二段階は、4組のオリゴヌクレオチドプライマー(P1~P4)の合成である。P1とP2は約50ヌクレオチドを有する非ユニークオリゴマーであり、その各々は二本鎖cDNA合成を開始させるために使う。P1は、pVH1中の組換えシグナル配列のアンチセンス鎖に相同な配列の約20ヌクレオチドで始まり(5'から3'方向)(制限酵素“y”の認識配列を含む)、そしてVHフレームワーク領域3(FR3)の最後の30ヌクレオチドとハイブリダイズするアンチセンス配列の約30ヌクレオチドが続く。最後の約30ヌクレオチドに渡り、異なるVHファミリーの全てとハイブリダイズする1組のプライマーを生じるように任意塩基が組み込まれる。第二のオリゴヌクレオチドP2は、センス方向にあり、そしてpVH1中の制限部位“x”で始まる約50ヌクレオチドと相同である。これは“x”制限部位、イントロンの最後の約20ヌクレオチド、およびFR1の最初の約30ヌクレオチドを含む。やはり、最後の約30ヌクレオチドは、異なるVH領域セグメントを収容するように非ユニークである。オリゴヌクレオチドP3およびP4は、それぞれP1およびP4の最初の約20ヌクレオチドに相同である。それらのオリゴ体はVセグメント中への新規突然変異の導入を回避するためにユニークであり、そしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって二本鎖cDNAを増幅するのに使われる。

重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の可変セグメントにハイブリダイズすることができ且つ該セグメントの合成を開始することができるプライマーP1およびP2の3'末端部分は、当業者によって容易に決定することが

できる。例えば、多数のヒトVH遺伝子のヌクレオチド配列が発表されている。例えば、Bernan, J. E. ら(1987), EMBO J., 7, 727-738およびKabat, E. A. ら(1987), Sequences of Protein of immunological Interest, U. S. Dept. Health & Human Services, Washington, D. C.を参照のこと。同様に、ヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のVセグメントを同定および/または作製するのに使う時、プライマーP1およびP2の3'末端部分は、発表された配列から容易に決定することができる。例えば、Kabat, E. A. ら(前掲)を参照のこと。一般に、様々なVセグメント間で保存されるヌクレオチド部分は、P1およびP2プライマーの3'部分においても保存される。可変セグメントの中で変形が観察されるようにそれらのヌクレオチド部分については、対応するP1およびP2プライマー中のそのようなヌクレオチド部分を同様に変形して、異なるVHまたはVLセグメントにハイブリダイズすることができるプライマーのプールを含んで成るP1およびP2プライマーを提供する。

次の段階は、それらのオリゴヌクレオチドプライマーを使って、ベクターpVH1中でヒト重鎖V領域cDNA配列のライブラリーを作製することである。P1は、ヒトB細胞ポリA⁺RNAからの第一鎖cDNA合成を開始させるために使う。該RNAを塩基加水分解し、そしてP2を使って第二鎖の合成を開始させる。次いで全長の二本鎖cDNAをアクリルアミドゲル上で精製し、電気溶出せしめ、そしてオリゴヌクレオチドプライマーP3およびP4を使うポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅のために鋳型として使用する。あるいは、常法によってまずcDNAを合成し、このcDNAをP1開始リアクターのための鋳型として使用する。次いで増幅された生成物(約0.3kb)をゲル精製し、制限酵素“x”および“y”で切断し、そしてpVH1中にクローニングする。

生成したcDNAライブラリーは、可変領域セグメントの合成ゲノムライブラリーを表し、可変セグメントの従来のゲノムライブラリーを上回る3つの利点を提供する。第一に、従来のライブラリーは50%まで偽遺伝子配列を含んでいるが、このライブラリーは偽遺伝子を全く含まない。第二に、合成ライブラリーは、従来のライブラリーよりもずっとコンパクトであり、20kbあたり1個の機能的セグメントに対比して、2kbのDNAあたり1個の機能的V遺伝子を含む。最後に、このアプローチは操作に利用可能であるVセグメントプロモーター配列を残す。

そのようなcDNAライブラリーは、差別的発現のために特定の生殖細胞型Vセグメントの方に偏り得る。偏りの2つの源は(i) Vセグメント組換えの差別的な速度、および(ii) Vセグメントを発現するB細胞クローンの差別的選択である。第一の偏り源は2つの方法で処理される。第一に、偏りは胎児性免疫グロブリンレパートリーにおいて最も顕著であるため、B細胞RNAの源として胎児性組織を避ける。第二に、半ランダムプライマーP1お

よびP2を、各々が異なるVセグメントファミリーと選択的に交差ハイブリダイズするプールに分ける。次いでそれらのプライマーを使って4〜6つの別個のライブラリーを作製し、こうしてV領域ファミリーの全てが提示されることを保証する。第二の偏り源であるB細胞クローンの差別的選択もまた、同様な2つの方法で処理される。第一に、最小の割合の抗原選択B細胞を含むRNA源を使用する。リンパ節と脾臓を避ける。成体の骨髄は未選択B細胞の1つの源である。しかしながら、それは前B細胞由来の転写される偽遺伝子配列を高い割合で含む。RNAの別の源は全血である。循環しているB細胞の90%が未成熟の μ または μ , δ を発現している細胞であり、そして最近の骨髄移住物である。しかしながら、抗原選択されたIgG発現細胞のレベルは、個体の免疫状態に大きく依存する。従って、単離されたポリA⁺RNAを、特異的プローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションにより、特定のB細胞配列について調べる。脾RNAを使うことがより実用的である場合、およびこのRNAが高い比率のIgG配列を含む場合、選択の偏りを最小にするために第二のアプローチが使われる。cDNAの第一鎖合成を、IgM転写物に特異的な約40ヌクレオチドの定常領域エクソン2プライマーにより開始させる。次いでP2を用いて第二鎖合成を開始し、そしてP1を用いて第三巡目の合成を開始する。この第三巡目の合成からのcDNAは、P3とP4を使ったPCR増幅のための鋳型を提供する。

可変領域ライブラリーが作製されれば、その中に使われたVセグメントを、標準技術により、例えばファミリー特異的もしくはセグメント特異的オリゴヌクレオチドを用いた配列決定および/またはハイブリダイゼーション並びにPCR法による差別的増幅により、同定することができる。そのようなVセグメントライブラリーの特徴付けは、特定の生物におけるVセグメントの使用頻度および分布に関する情報を提供し、結果として、本発明の種々のトランスジェンの作製に使うことのできるVセグメントの同定を提供する。かくして、上述の小遺伝子座トランスジェン構成物において1または複数の有力V遺伝子セグメントを使うことができる。更に、そのようなライブラリーから選択したクローンを使って、頻繁に使われるVセグメントを含むゲノム断片を同定し、特定の所望のVセグメントを含むゲノム断片の同定を容易にすることができ

る。加えて、合成Vセグメントレパートリーは、ライブラリー配列の連結によって作製することができる。注入配列の数百コピーを含む大きな反復性トランスジェン縦列整列は、一般にトランスジェニックマウスの製造の際に作製される。それらの縦列整列は通常非常に安定である。しかしながら、合成V領域の安定性を確実にするために、各々2kbのV領域セグメント間のランダムDNAブロックが好ましくは導入される。それらのランダムDNAブロックは、優性調節要素の挿入を防ぐように、ゲノムDN

Aを消化し次いで再連結することにより調製される。ゲノムDNAは、好ましくは4種の頻繁な切断制限酵素:Alu I, Dpn I, Hae IIIおよびRsa Iで消化される。この消化は平均長さ64ヌクレオチドを有する平滑末端断片を生成する。50〜100ヌクレオチドのサイズ範囲の断片をアクリルアミドゲルから溶出せしめ、次いで再連結する。再連結されたDNAをMbo Iで部分消化し、サイズ分画する。0.5〜2kbの範囲内の断片を、pVH1の作製に使ったベクターのポリリンカーのBamH IまたはBgl II部位中にクローニングする。

ランダム配列ライブラリーを合成Vセグメントライブラリーと組み合わせて合成Vセグメントレパートリーを造成する。ランダム配列ライブラリーからの挿入断片を酵素“w”および“z”で遊離せしめ、ベクター配列から分離精製する。合成Vセグメントライブラリーからの挿入断片を酵素“w”および“z”での消化により単離する。Vセグメント挿入断片を精製する前に、このDNAを子ウシ腸ホスファターゼで処理して自己連結を防止する。次いでVセグメント挿入断片をランダム挿入断片と一緒に連結せしめ、合成Vセグメントレパートリーを含む交互縦列整列を作製する。この連結混合物をショ糖勾配上でサイズ選別し、50〜100kb分画を、例えばD-J一定常小遺伝子座構成物と一緒に、マイクロインジェクトする。介在するクローニング段階を伴わずに合成Vセグメントレパートリーを直接注入することにより、注入断片の縦列整列が単一部位に挿入されるようになるという事実を利用することが可能である。この場合、そのような縦列整列は完全には重複ではなくて、更なる多様性をもたらす。あるいは、合成VセグメントレパートリーをD-J-C小遺伝子座と組み合わせて重鎖トランスジェンを形成せしめることもできる。

合成軽鎖免疫グロブリンセグメントレパートリーも同様に、適当な軽鎖遺伝子座用のプライマーを使って作製することができる。

内因性免疫グロブリン遺伝子鎖の機能的破壊

好結果に再配列された免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンの発現は、トランスジェニック非ヒト動物中の内因性免疫グロブリン遺伝子の再配列を抑制することにより優性作用を有すると予想される。しかしながら、内因性抗体を欠く非ヒト動物を生成せしめる別の方法は、内因性免疫グロブリン遺伝子座を突然変異せしめることによるものである。胚性幹細胞技術および相同組換えを使って、内因性免疫グロブリンレパートリーを容易に排除することができる。下記はマウス免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊を説明する。しかしながら、開示されるベクターおよび方法は、他の非ヒト動物における使用に合わせて容易に改変することができる。

簡単に言えば、この技術は、生殖細胞組織に分化することができる多分化能性細胞系における、相同組換えによる遺伝子の不活性化を包含する。マウス免疫グロブリン

10

20

30

40

50

ンの変更コピーを含むDNA構成物を胚性幹細胞の核に導入する。その細胞の一部において、導入されたDNAがマウス遺伝子の内因性コピーと組み換わり、それを変更コピーで置き換える。新たに操作された遺伝的損傷を含む細胞を宿主マウス胚に注入し、それを受容体の雌に再移植する。それらの胚の一部が変異細胞系に完全に由来する生殖細胞を有するキメラマウスに発達する。従って、キメラマウスを交配することにより、導入された遺伝的損傷を含むマウスの新規系列を獲得することが可能である【Capecchi (1989) *Science*, 244, 1288-1292により概説されている】。

マウス λ 遺伝子座は免疫グロブリンのわずか5%に寄与するため、重鎖および/または κ 軽鎖遺伝子座の不活性化で十分である。それらの遺伝子座の各々を破壊するには3つの方法があり、J領域の欠失、J-Cイントロンエンハンサーの欠失、および終結コドンの導入による定常領域コード配列の破壊である。DNA構成物デザインの見地から、最後の方法の選択が最も簡単である。 μ 遺伝子の排除はB細胞の成熟を破壊し、それによっていくつかの機能的重鎖セグメントにクラススイッチすることを防ぐ。それらの遺伝子座を破壊（ノックアウト）する方策を下記に概説する。

マウス μ および κ 遺伝子を破壊するためには、Jaenischおよび共同研究者 [Zijlstraら (1989), *Nature*, 342, 435-438] によりマウス β 2ミクログロブリン遺伝子の好結果の破壊に使われたデザインを基にした標的ベクターを用いる。プラスミドpMCIneoからのネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を標的遺伝子のコード領域中に挿入する。pMCIneo挿入断片はneo発現を指令するのにハイブリッドウイルスプロモーター/エンハンサー配列を使う。このプロモーターは胚性幹細胞中で活性である。従って、破壊（ノックアウト）構成物の組込みのための選択マーカーとしてneoを使うことができる。ランダム挿入現象に対する陰性選択マーカーとしてHSVチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子を該構成物の末端に付加する (Zijlstraら、前掲)。

重鎖遺伝子座を破壊するための標的ベクターを図7に示す。重鎖遺伝子座を破壊するための第一方策はJ領域の削除である。この領域はマウスではかなり小さく、わずか1.3kbに及ぶ。遺伝子標的ベクターを作製するために、マウスゲノムライブラリーからの分泌されたA定常領域エクソンの全部を含む15kbのKpn I断片を単離する。1.3kbのJ領域をpMCIneoからの1.1kb挿入断片により置き換える。次いで該Kpn I断片の5'末端にHSV tk遺伝子を付加する。相同組換えによるこの構成物の正しい組込みは、neo遺伝子によるマウスJ μ 領域の置換をもたらすだろう (図7)。neo遺伝子を基にしたプライマーとD領域中のKpn I部位の5'のマウス配列に相同のプライマーとを使って、PCRにより組換え体をスクリーニングする。

あるいは、 μ 遺伝子のコード領域を破壊することにより重鎖遺伝子座を破壊（ノックアウト）する。このアプローチは、上記アプローチで使ったものと同じ15kbのKpn I断片を必要とする。pMCIneoからの1.1kb挿入断片をエクソンII中のユニークBamH I部位のところに挿入し、そしてHSV tk遺伝子を3' Kpn I末端に付加する。次に、neo挿入断片の両側における二重交差（これはtk遺伝子を削除する）を選択する。それらは、選択されたクローンのプールからPCR増幅により検出される。PCRプライマーの一方はneo配列に由来し、そして他方は標的ベクターの外側のマウス配列に由来する。マウス免疫グロブリン遺伝子座の機能的破壊は実施例に記載される。再配列された免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物

再配列されていない小遺伝子座Igトランスジェンを含有する上述のトランスジェニック動物の基礎をなす前提は、天然の免疫グロブリン遺伝子座に見つかる種々の遺伝子セグメントの全部を含める必要なしに完全な抗体レパートリーを作製することが可能であることである。理論的には、二次レパートリーを減少させずに、一次レパートリーに貢献する異なる配列の数を減らすことが可能である。任意の特定抗原に対してT細胞依存性応答を開始するのに十分な多様性が一次レパートリーにある限り、体細胞高度突然変異がその抗原に対する高親和性抗体を提供することができるだろう。

この概念は、ヘテロログスの抗体レパートリー全体が体細胞突然変異により完全に作製される本発明のこの観点において更に前進する。抗原結合部位は、アミノ末端重鎖ドメインとアミノ末端軽鎖ドメイン間の界面により造られる。抗原と相互作用するそれらの各ドメインの内部のCDR1, 2および3残基は、 β 鎖を連結する3つの異なるループ上に位置する。前に記載したように、それらの領域は、異なる抗原を認識する異なる抗体分子間で最大の配列多様性を有する。よって、抗体レパートリーはCDR1, 2および3の配列多様性により決定される。完全な抗体レパートリーを生成するCDR1, 2および3の多様性は3つの源に由来する：組換え多様性、結合多様性および体細胞突然変異。CDR1とCDR2のところの組換え多様性は、異なるCDR1および2配列を含む異なるVセグメントの選択から生じる。CDR3のところの組換え多様性は、異なるDおよびJセグメントの選択から生じる。結合多様性はCDR3多様性にのみ貢献し、V領域全体にまたがって作用する体細胞突然変異は、3つの相補性決定領域の全ての多様性に貢献する。組換えおよび結合多様性は一緒に一次レパートリーの多様性に貢献する (図1)。VDJ結合はIgMを発現する一次B細胞のセットを生じる。

外来抗原に対して或る最小限の親和性を有す細胞表面IgM分子を発現する任意の一次レパートリーB細胞は、IgMとしてその抗原を細胞内に取り込み、そして細胞表面

を元に戻す。次いで該抗原は処理され、関連したペプチドがクラスII MHC分子により細胞表面上に提示される。十分な外来抗原が細胞表面上に提示されれば、これがT細胞応答を開始させ、次いでT細胞応答がB細胞のT細胞依存性成熟を開始させる。これがいわゆる二次応答である(図8)。この応答の一部は、免疫グロブリン遺伝子の変換領域の高度突然変異に関係する。従って二次応答を受けたB細胞クローンは、常に、変更された免疫グロブリン分子を有する新規クローンを生じる。外来抗原に対する、より高い親和性を持つこれらクローンは、発現された抗体の親和性成熟をもたらす。体細胞高度突然変異は全V領域にまたがって起こるため、親和性の成熟の過程に対する理論的制限はない。

本発明のこの観点では、完全な抗体応答を生ぜしめるのにCDR1およびCDR2多様性は不要である。むしろ、VJおよびVDJ結合により造られるCDR3多様性が、多様の異なる抗原に対して高親和性抗体を産生するT細胞依存性成熟を開始させるのに十分な最少限の親和性を提供するであろう。よって、一次多様性を用いずに広範囲の抗体レパートリーを作製するための方法およびトランスジェニック動物が提供される。そのような多様性は、抗体多様性の発生のための体細胞突然変異に頼っている。親和性成熟の過程の間に、体細胞突然変異は、刺激抗原に対して高いというよりむしろ低い親和性を有する多数のクローンを生ぜしめる。それらのクローンの大部分は選択されず、死に絶えてしまう。しかしながら、それらのクローンの1つが更に存在する新規抗原に対して親和力を有するならば、このクローンは増殖して新規抗原に対する親和性成熟を受ける(図9)。本発明のこの観点では、再配列されたヒト重鎖および軽鎖を有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばマウスを組み合わせると、既知抗原に対して低い親和性を有する抗体を形成する。この動物に既知抗原を注入した場合、そのB細胞は二次応答を受け、その抗原に対する高親和性抗体の産生を引き起こす。しかしながら、このマウスに既知抗原と新規抗原の混合物を注入し、次いで新規抗原のみでチャレンジした場合には、上述の分岐過程により、新規抗原に対する高親和性抗体が産生される。このアプローチは次の2つの主な利点を有する：第一に、トランスジェニック構成物が容易に作製できること；そして第二に、再配列されたトランスジェニックは、内因性マウス遺伝子の再配列を対立遺伝子的小およびアイソタイプ的に排除でき、よって上述した相同組換えによりそれらの遺伝子を排除する必要がなくなる。

本発明のこの態様の第一段階は、既知抗原に対して向けられたIgM抗体を発現するヒトハイブリドーマからの、再配列された重鎖および軽鎖遺伝子の単離である。理想的ハイブリドーマは、良好なマウスT細胞応答を生ぜしめることができる容易に入手可能な抗原を認識するものである。そのようなヒトハイブリドーマは多数現存

し、それらとしては、破傷風毒素、シュードモナス、またはグラム陰性菌といった有望な抗原と反応するものが幾つか挙げられる〔JamesおよびBourla (1987) *J. Immunol. Methods*, 100, 5-40により概説されている〕。完全な再配列された重鎖遺伝子はDNAの単一段片(約20kb)上に単離され、一方3'エンハンサーを含む再配列されたκ軽鎖遺伝子は第二のDNA断片(約20kb)上に単離される。それらの各断片は、ハイブリドーマから単離されたDNAから作製したλファージライブラリーから単離されたクローンから一緒に継ぎ合わされる。2つの構成物、即ち重鎖構成物と軽鎖構成物が作製される。

重鎖構成物(図10)は、ヒトγ3およびγ1定常領域を含む25kb断片とその後方のラット重鎖3'エンハンサー〔Petterssonら(1990), *Nature*, 344, 165-168〕を含む700bp断片に連結された、再配列されたIgH遺伝子を含む20kbのハイブリドーマ断片から成る。軽鎖構成物は、再配列されたκ鎖と3'エンハンサーとを含む20kbの完全DNA断片である。それら2つの構成物を、それらがマウスゲノム中の単一部位において組み込まれるように、同時注入する。トランスジェニックマウスをトランスジェニックmRNAの発現についてノーザンブロット分析により試験する。次いで尾部血液試料においてFACS分析を実施し、トランスジェニックによりコードされるタンパク質の細胞表面発現を検出する。次いでマウスをもとのハイブリドーマにより認識される抗原で免疫処置する。尾部血液試料に関してELISAおよびFACS分析を実施してクラススイッチを検出する。最後に、もとの抗原と一緒に抗原のパネルを同時注入することにより、多数の異なる抗原に応答する能力についてマウスを試験する。尾血液をELISAにより分析し、個々の抗原に対して向けられた高親和性ヒトIgG抗体の産生を検出する。

このトランスジェニックマウスを、特定抗原に対して向けられたヒト抗体の産生に使用するためには、その抗原を、好ましくは、遺伝子をそれから単離したところのハイブリドーマに関連する抗原と一緒に、初めに同時注入する。このハイブリドーマ関連抗原は補抗原(しばしば第二抗原)と呼ばれ、新規抗原は単に抗原(または第一抗原)と呼ばれる。可能であれば、第二抗原は注入前に第一抗原に化学的に架橋結合される。これは、第一抗原を一次トランスジェニック提示B細胞により取込みおよび提示させ、それによって第一抗原を認識する活性化ヘルパーT細胞のプールの存在を保証する。典型的な免疫処置スケジュールは次の通りである。第1日：完全フロイントアジュバント中で第二抗原と混合したまたはそれに架橋結合した第一抗原をマウスに腹腔内(ip)注射する。第14日：第一抗原(第二抗原を含まない)を不完全フロイントアジュバント中でip注射する。第35日：不完全フロイントアジュバント中の第一抗原を繰り返し注射する。第45日：尾部血液試料においてELISAにより抗体応答について試験する。第56日：良好な応答者に不完全

フロイントアジュバンド中の抗原を繰り返し注射する。
第59日：良好な応答者の脾臓を融合する。

本発明の別の観点では、Ig遺伝子をそれから単離したところハイブリドーマにより認識される抗原を免疫原として使う。次いでもとの抗体の体細胞突然変異形を発見する免疫処置動物から、新規トランスジェニックハイブリドーマを単離する。それらの新規抗体は、もとの抗原に対して一層高い親和性を有するだろう。この抗体「研磨 (sharpening)」法は、CDR移植術により作製された (E. P. 公開番号239400、1987年9月30日に公開) かまた

10 は細菌 [W. D. Huseら (1989) *Science*, 246, 1257] もしくはファージ [T. Clacksonら (1991) *Nature*, 352, 624] 発現ライブラリーから単離された抗体遺伝子にも適用することができる。

単配列されたまたは再配列されていない免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖トランスジェンを含有するトランスジェニック非ヒト動物
上記態様は、完全に再配列されたまたは完全に再配列されていない重鎖および軽鎖免疫グロブリントランスジェンを使って、異種抗体を産生することのできるトランスジェニック非ヒト動物を製造することを記載した。本発明の更なる観点では、上述のいずれかの再配列されていないトランスジェンおよび再配列されたトランスジェンを組み合わせて使用してトランスジェニック動物において重鎖および軽鎖トランスジェンを提供することにより、少なくとも1つの再配列された免疫グロブリントランスジェンと少なくとも1つの再配列されていない免疫グロブリントランスジェンを含有するトランスジェニック動物を製造する。この点に関して、再配列されていないトランスジェンは、重鎖または軽鎖のゲノムまたは小20 遺伝子座トランスジェン構成物を含んで成ることができ、再配列されたトランスジェンは再配列された適当なトランスジェンを含んで成ることができ。例えば、再配列されていない小遺伝子座軽鎖トランスジェンを使う場合、他方の適当なトランスジェンは完全に再配列された重鎖トランスジェンである。しかしながら、再配列されたトランスジェンが再配列された免疫グロブリン軽鎖トランスジェンを含んで成り、そして再配列されていないトランスジェンが免疫グロブリン重鎖ゲノムまたは小30 遺伝子座トランスジェン、最も好ましくは、関連したAおよびy定常領域を有する再配列されていないトランスジェンを含んで成ることが好ましい。

再配列されたトランスジェンと再配列されていないトランスジェンとの組合せは、一次レパートリーB細胞内での多様性の中間レベルを提供する。一次レパートリーB細胞における再配列されたトランスジェン中のCD1、CD2およびCD3の一次多様性は固定されるけれども、再配列されていないトランスジェンの再配列によって生じるCD40 RI、CD2およびCD3の一次多様性は、再配列された重鎖および軽鎖トランスジェンを使った時に得られるB細胞

クローンよりも高い潜在的な多様性を有するB細胞の一次レパートリーの集団を提供する。そのような一次多様性は、そのような細胞が体細胞突然変異によって外来抗原に反応すると、拡大された二次多様性を提供する。

核酸

用語「実質的に相同な」核酸とは、2つの核酸が、または指定されたその配列が、最適に整列しそして比較した時に、少なくとも約80%のヌクレチド、通常は少なくとも約90%~95%、より好ましくは少なくとも約98%~99.5%のヌクレチドが同一である (適当なヌクレチド挿入または欠失を伴って) ことを指摘する。あるいは、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下でその鎖の相補体にハイブリダイズする時、実質的な同一性が存在する。核酸は完全細胞中に、細胞溶解物中に、または部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形で、存在することができる。核酸は、標準技術により、例えばアルカリ/SDS処理、CsClバンド沈降、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当業界で公知の他の方法により、他の細胞成分または他の汚染物、例えば他の細胞性核酸もしくはタンパク質から分離精製された時、「単離され」または「実質的に純粋にされ」る。F. Ausubelら編、*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) を参照のこと。

本発明の核酸組成物は、しばしば天然の配列 (修飾された制限部位等を除き) の形であるが、遺伝子配列を提供するための標準技術に従ってcDNA、ゲノムDNAまたは混合物のいずれかから突然変異されることができ。コード配列については、それらの変異は、所望であればアミノ酸配列に影響してもよい。特に生来のV, D, J, 定常、スイッチおよび他の本明細書中に記載のそのような配列に実質的に相同であるかまたはそれから誘導されるDNA配列が考えられる (ここで、「誘導される」とは、ある配列が別の配列と同一であるかまたは変更されていることを指摘する)。

核酸はそれが別の核酸配列と機能的関係に置かれる時、「作用可能に連結される」という。例えば、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列の転写に作用するならば、それらはコード配列に作用可能に連結されている。転写調節配列については、作用可能に連結されるとは、連結されるDNA配列が隣接であって、そして2種のタンパク質コード領域を連結することが必要な場合には、隣接であって且つ読み枠内であることを意味する。スイッチ配列については、作用可能に連結されるとは、該配列がスイッチ組換えを行うことができることを意味する。

特定の好ましい態様

本発明の好ましい態様は、実施例16に記載のトランスジェンの単一コピーを含有する動物と交配させた実施例14に記載のトランスジェン (pHC2) の単一コピーを含有

する動物、並びに実施例 9 および 12 に記載の JH 欠失動物から繁殖させた子孫である。動物はそれらの 3 つの特性について同型接合に交配される。そのような動物は次の遺伝子型を有する：再配列されていないヒト重鎖小遺伝子座（実施例 14 に記載）の単一コピー（染色体の一倍体 1 組あたり）、再配列されたヒト κ 軽鎖構成物（実施例 16 に記載）の単一コピー（染色体の一倍体 1 組あたり）、および機能的 JH セグメントの全部を除去する各内因性マウス重鎖遺伝子座の欠失（実施例 9 および 16 に記載）。そのような動物は、JH 欠失について同型接合であるマウスと交配させると、JH セグメントの欠失について同型接合でありそしてヒト重鎖および軽鎖構成物については半接合である子孫を生産する。生じた動物に抗原を注入し、それらの抗原に対するヒトモノクローナル抗体の産生に使う。

そのような動物から単離された B 細胞は、それらが各遺伝子の単一コピーのみを含むため、ヒト重鎖および軽鎖に関して単一特異性である。更に、それらはヒトまたはマウス重鎖に関して単一特異性であろう。というのは、実施例 9 および 12 に記載のようにして導入された JH 領域に広がる欠失によって、両方の内因性マウス重鎖遺伝子コピーが非機能的であるためである。更に、B 細胞の実質的部分はヒトまたはマウス軽鎖に関して単一特異性であろう。何故なら、再配列されたヒト κ 軽鎖遺伝子の単一コピーの発現が、B 細胞の実質的部分における内因性マウス κ および λ 鎖遺伝子の再配列を対立遺伝子的小およびアイソタイプ的に排除するだろうからである。

好ましい態様のトランスジェニックマウスは、理想的には生来のマウスのものと実質的に同じである、有意なレパートリーを有する免疫グロブリン産生を示すだろう。例えば、内因性 Ig 遺伝子が不活性化されている時、総免疫グロブリンレベルは約 0.1~10mg/ml 血清、好ましくは 0.5~5mg/ml、理想的には少なくとも約 1.0mg/ml の範囲であろう。IgM から IgG にスイッチすることができるトランスジェンをトランスジェニックマウスに導入した時、血清 IgG 対 IgM の成熟マウス比は好ましくは約 10:1 である。もちろん、IgG 対 IgM 比は、未成熟マウスではずっと低いだろう。一般に、脾臓およびリンパ節 B 細胞の約 10% より多く、好ましくは 40~80% が、もっぱらヒト IgG タンパク質のみを発現する。

レパートリーは理想的には非トランスジェニックマウス中にしめされるものとほぼ等しく、通常は少なくとも約 10% ほど高く、好ましくは 25~50% またはそれ以上高いだろう。マウスゲノム中に導入される異なる V, J および D 領域の数に主として依存して、通常少なくとも約 100 種の異なる免疫グロブリン（理想的には IgG）、好ましくは 10^4 ~ 10^6 またはそれ以上の免疫グロブリンが産生されるだろう。それらの免疫グロブリンは、典型的には、高抗原性タンパク質の約半分またはそれ以上を認識するだろう。抗原性タンパク質としては、ハトチクロ

ーム C、ニワトリリゾチーム、アメリカヤマゴボウのマイトジェン (PWM)、ウシ血清アルブミン、アオガイヘモシアニン、インフルエンザ赤血球凝集素、スタフィロコッカスプロテイン A、マッコウクジラミオグロビン、インフルエンザノイラミニダーゼおよび入リブレッサータンパク質が挙げられるがそれに限定されない。上記免疫グロブリンの幾つかは、予め選択された抗原に対して、少なくとも約 10^{-7} M⁻¹、好ましくは 10^{-9} M⁻¹~ 10^{-6} M⁻¹ またはそれ以上の親和性を示すだろう。

上記に本発明のトランスジェニック動物の好ましい態様を記載したけれども、他の態様は本明細書の開示により、そしてより特定には実施例に記載のトランスジェンにより定義される。トランスジェニック動物の 4 つのカテゴリーが定義され得る：

- I. 再配列されていない重鎖免疫グロブリントランスジェンと再配列された軽鎖免疫グロブリントランスジェンとを含有するトランスジェニック動物。
- II. 再配列されていない重鎖免疫グロブリントランスジェンと再配列されていない軽鎖免疫グロブリントランスジェンとを含有するトランスジェニック動物。
- III. 再配列された重鎖免疫グロブリントランスジェンと再配列されていない軽鎖免疫グロブリントランスジェンとを含有するトランスジェニック動物。
- IV. 再配列された重鎖免疫グロブリントランスジェンと再配列された軽鎖免疫グロブリントランスジェンとを含有するトランスジェニック動物。

トランスジェニック動物の上記カテゴリーの、好ましい優先順序は I > II > III > IV である。

トランスジェニック動物の上記のカテゴリーの各々の範囲内で、多数の可能な組合せが好ましい。そのような好ましい態様は下記のものを含んで成る。

カテゴリー I

- (a) 実施例 7 または 16 の動物と交配させた実施例 1 と 2 または 19 と 20 の動物。
- (b) 実施例 7 または 16 の断片と同時注入した実施例 1 または 19 の断片。
- (c) 実施例 7 または 16 の動物と交配させた実施例 5 (H, I または J), 14, 17 または 21 の動物。
- (d) 実施例 7 または 16 の構成物と同時注入した実施例 5 (H) または 14 の構成物。

(e) 実施例 9, 11, 12 または 13 の動物と交配させた上記の全て。特に好ましい態様は実施例 9 または 12 または 13 の動物と交配させた上記の全てである。

カテゴリー II

- (a) 実施例 6, 3, 4, 16, 22 または 23 の動物と交配させた実施例 1, 2, 19 または 20 の動物。
- (b) 実施例 2 または 20 に記載の断片と同時注入した実施例 1 または 19 に記載の断片。
- (c) 実施例 6 (B, C または D) または 16 の動物と交配させた実施例 5 (H, I または J), 14, 17 または 21 の動

物。

(d) 構成物 6 (B) または 16 と同時注入した構成物 5 (H) または 14。

(e) 実施例 6 (B, C または D) または 16 の動物と交配させた実施例 1, 2, 19 または 20 の動物。

(f) 実施例 5 (H, I または J), 14, 17 または 21 の動物と交配させた実施例 3, 4, 22 または 23 の動物。

(g) 実施例 9, 10, 11, 12 または 13 の動物と交配させた上記の全て。

カテゴリー III

(a) 実施例 8 または 15 の動物と交配させた実施例 3, 4, 22 または 23 の動物。

(b) 実施例 8 または 15 の断片と同時注入した実施例 3 または 23 の断片。

(c) 実施例 8 または 15 の動物と交配させた実施例 6 (B, C または D) または 16 の動物。

(d) 実施例 8 または 15 の構成物と同時注入した実施例 6 (B) または 15 の構成物。

(e) 実施例 9 ~ 13 の動物と交配させた上記の全て。

カテゴリー IV

(a) 実施例 8 または 15 の動物と交配させた実施例 7 または 16 の動物。

(b) 実施例 8 または 15 の構成物と同時注入した実施例 7 または 16 の構成物。

(c) 実施例 9 ~ 13 の動物と交配させた上記の全て。

下記は例示のつもりで与えられ、請求の範囲に対する限定と解釈してはならない。

方法および材料

トランスジェニックマウスは、Hogan ら、"Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory に従って誘導される。

胚性幹細胞は、発表された方法に従って操作される [Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E. J. Robertson 編, IRL Press, Washington, D. C., 1987; Zijlstra ら (1989), *Nature*, 342, 435-438; および Schwartzberg, P. ら (1989), *Science*, 246, 799-803]。

DNA クローニング方法は、J. Sambrook ら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. に従って実施される。

オリゴヌクレチドは、製造業者により与られた規格書に従って Applied Biosystems のオリゴヌクレチド合成装置上で合成される。

ハイブリドーマ細胞および抗体は、"Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow および David Lane 編, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) に従って操作される。実施例 1 ここでは、本発明に従う実験の一般的手順を示す

ゲノム重鎖ヒト Ig トランスジェン

この実施例は、マウスの接合子中にマイクロインジェクトされるヒトゲノム重鎖免疫グロブリントランスジェンのクローニングとマイクロインジェクションを記載する。

Marzluff, W. F. ら (1985), "Transcription and Translation: A Practical Approach", B. D. Hammes および S. J. Higgins 編, 89-129 頁, IRL Press, Oxford により記載されたようにして、新鮮なヒト胎盤組織から核を単離する。単離された核 (または PBS で洗浄したヒト精母細胞) を低融点アガロース母材中に埋め込み、EDTA とプロテイナーゼ K で溶解せしめて高分子量 DNA を暴露させ、この DNA を次いで M. Finney により *Current Protocols in Molecular Biology* (F. Ausubel 編, John Wiley & Sons, 増補 4 版, 1988, 第 2. 5. 1 章) 中に記載された通りにアガロース中で制限酵素 Not I で消化する。

次いで Not I 消化 DNA を、Anand, R. ら (1989), *Nucl. Acids Res.*, 17, 3425-3433 により記載されたようにパルスフィールドゲル電気泳動により分画する。Not I 断片に富む画分をサザンブロットハイブリダイゼーションによりアッセイし、この断片によりコードされる 1 または複数の配列を検出する。そのような配列は、重鎖 D セグメント、J セグメント、 μ および γ 1 定常領域と一緒に 6 種の VH ファミリーの全部の代表物を含む (この断片は、Berman ら (1988) 前掲により HeLa 細胞から 670 kb 断片として同定されているが、本発明者らはヒト胎盤および精子 DNA から 830 kb 断片断片としてであることを発見した)。この Not I フラグメントを含むこれら画分を図 4 に示す。

一般的な実験手順を示すと、所望の或る画分をプールし、そして酵母細胞中の pYACNN のベクターの Not I 部位にクローニングする。プラスミド pYACNN は、pYAC-4Neo [Cook, H. ら (1988), *Nucl. Acids Res.*, 16, 11817] を EcoR I で消化しそしてオリゴヌクレチド 5' -AAT TCG GCG CGC -3' の存在下で連結せしめることにより調製する。

Brownstein ら (1989), *Science*, 244, 1348-1351 および Green, E. ら (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1213-1217 により記載されたようにして、重鎖 Not I 断片を含む YAC クローンを単離する。M. Finney 前掲により記載されたパルスフィールドゲル電気泳動により、高分子量酵母 DNA からクローニング Not I 挿入断片を単離する。1 mM のスベルミンの添加によりこの DNA を凝縮させ、上述の単細胞胚の核に直接マイクロインジェクトする。

実施例 2

不連続ゲノム重鎖 Ig トランスジェン

VH6, D セグメント、J セグメント、 μ 定常領域および一部の γ 定常領域を含むヒトゲノム DNA の 110 kb Spe I 断片 (図 4 参照) を実施例 1 に記載の如く YAC クローニングにより単離する。

記載されたように V1 ~ V5 の複数コピーを含む上述の 67

0-830 kd Not I断片の上流の570 kd Not I断片を単離する。[Betmanら (1988) 前掲は2つの570kb Not I断片を検出した。その各々から多数のVセグメントを含む。]

上記2断片を実施例1に記載の如くマウス単細胞胚の核に同時注入する。

2つの異なるDNA断片の同時注入は、通常、染色体内の同じ挿入部位のところへの両断片の組込みを引き起こすだろう。従って、2断片の各々の少なくとも1コピーを含む有する生成トランスジェニック動物の約50%が、定常領域含有断片の上流に挿入されたVセグメントを有するだろう。それらの動物のうち、110kb Spe I断片の位置に関する570kb Not I断片の方向に依存して、50%がDNA逆位により、そして50%が欠失により、V-DJ結合を達成するだろう。生成したトランスジェニック動物からDNAを単離し、そしてサザンブロットハイブリダイゼーションにより両トランスジェンを含むことがわかったそれらの動物（詳しくは、多数のヒトVセグメントとヒト定常領域遺伝子の両方を含む動物）を、ヒト免疫グロブリン分子を発現する能力について試験する。

実施例3

生体内相同組換えにより形成されるゲノムκ軽鎖ヒトIgトランスジェン

ヒトκ軽鎖の地図はLorez, W.ら (1987), *Nucl. Acid Res.*, 15, 9667-9677に記載されており、そして図11に描写される。

オリゴ-1 5' - CTT GAG CCC GCC TAA TGA GCG GGC TTT
TTT TTG CAT ACT GCG GCC - 3'

オリゴ-2 5' - GCA ATG GCC TGG ATC CAT GCG GCG CTA
GCA TCG ATA TCT AGA GCT CGA GCA - 3'

オリゴ-3 5' - TGC AGA TCT GAA TTC CCG GGT ACC AAG
CTT ACG CGT ACT AGT GCG GCC GCT - 3'

オリゴ-4 5' - AAT TAG CGG CCG CAC TAG TAC GCG TAA
GCT TGG TAC CCG GGA ATT - 3'

オリゴ-5 5' - CAG ATC TGC ATG CTC GAG CTC TAG ATA
TCG ATG CTA GCG CGC CAT GGA TCC - 3'

オリゴ-6 5' - AGG CCA TTG CGG CCG CAG TAT GCA AAA
AAA AGC CCG CTC ATT AGG CGG GCT - 3'

このプラスミドは、マイクロインジェクション用のベクター配列から単離することができる大挿入断片を構築するための、希少な切断性Not I部位により隣接された大きなポリリンカーを含む。このプラスミドは、pUC由来プラスミドに比べて比較的低コピーであるpBR322に由来する（pGP1は複製開始点の近くにpBR322コピー数調節領域を保持している）。低コピー数は挿入配列の潜在的毒性を減少させる。加えて、pGP1は、アンピシリン耐性遺伝子と前記ポリリンカーとの間に挿入された、trpA由

* Cκ全部、3' エンハンサー、全Jセグメントおよび少なくとも5つの異なるVセグメントを含む450kb Xho I-Not I断片（a）を単離し、そして実施例1に記載の如く単細胞胚の核にマイクロインジェクトする。

実施例4

生体内相同組換えにより形成されるゲノムκ軽鎖ヒトIgトランスジェン

上記成分の全部と更に少なくとも20個のVセグメントを含む750kb Mlu I-Not I断片（b）（図11参照）を実施例1に記載の如く単離し、そしてBssH IIで消化して約400kbの断片（c）を生成せしめる。

450kb Xho I-Not I断片（a）と約400kb Mlu I-BssH II断片（c）は、図11に示されるBssH II制限部位とXho I制限部位とにより限定される配列重複を有する。マウス接合子のマイクロインジェクションによるそれらの2断片の相同組換えは、450kb Xho I/Not I断片（実施例3）中に見つかるものよりも少なくとも15-20個追加のVセグメントを含むトランスジェンをもたらす。

実施例5

20 重鎖小遺伝子座の作製

A. pGP1およびpGP2の作製

pBR322をEcoR IとSty Iで消化し、下記のオリゴヌクレオチドと連結せしめることにより、図13に記載の制限部位を有する147塩基対の挿入断片を含むpGP1を作製する。それらのオリゴの概括的重複は図13にも示される。

オリゴヌクレオチドは下記のものである：

来の強力な転写ターミネーター配列 [Christie, G. E. ら (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*] も含む。これは、アンピシリンプロモーターから起こる読み過し転写を防ぐことにより、或る種の挿入断片に関係する毒性を減少させる。

プラスミドPG2は、ポリリンカー中に追加の制限部位（Sfi I）を導入するようにpGP1から誘導される。pGP1をMlu IとSpe Iで消化し、該プラスミドのポリリンカー部分の中の認識配列を切除する。

5' CGC GTG GCC GCA ATG GCC A 3'

5' CTA GTG GCC ATT GCG GCC A 3'

※ ラット定常領域の下流に置かれたエンハンサー配列を重鎖構成物中に導入する。

※ Petterssonら (1990), *Nature*, 344, 165-168により記載された重鎖領域 3' エンハンサーを単離し、クローニングする。次のオリゴヌクレオチド:

5' CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TGC 3'

5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3'

D. C_{μ} 領域のクローニング

pGP1をBamH IとHind IIIで消化し、次いで子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理する(図14)。このように処理された図14の断片(b)および図14の(c)を、BamH I/Hind IIIで切断したpGP1中にクローニングする。Hind III消化により断片(c)の正しい方向を確認し、C μ 領域をコードする12kb挿入断片を含むpCON1を得る。

pHIG1は、Not I部位により隣接されたポリリンカー中にSfi I 3' 部位とSpe I 5' 部位を有する18kbを挿入断片内にJセグメント、スイッチおよび μ 配列を含む故に、再配列されたVDJセグメントに使われるだろう。pCON1はJ領域を欠き12kb挿入断片のみを含むこと以外はpHIG1と同じである。再配列されたVDJセグメントを含む断片の作製におけるpCON1の使用については後に記載する。

E. $\gamma-1$ 定常領域のクローニング (pREG2)

ヒト γ -1領域のクローニングは図16に描写される。Yamamuraら(1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 2152-2156は、組込み時に部分的に削除されたトランスジェン構成物からの膜結合ヒト γ -1の発現を報告している。彼らの結果は、3' BamH I部位が、5kb未満のV γ -Cイントロンを有する経膜再配列されそしてスイッチされた γ 遺伝子コピーを含む配列の輪郭となることを指摘している。従って、再配列されていないスイッチされていない遺伝子では、最初の γ -1定常エクソンの5'未満から5kb未満のところで始まる配列中にスイッチ領域全体が含まれる。従ってそれは5' 5.3kb Hind III断片中に含まれる [Ellison, J. W. ら (1982), Nucleic Acids Res., **10**, 4071-4079]。Takahashiら (1982), Cell, **29**, 671-679もまた、この断片がスイッチ配列を含むことを報告しており、この断片と7.7kb Hind III-BamH I断片とを合わせると我々がトランスジェン構成物に必要とする配列の全部を含むに違いない。

30 Yamamuraら (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2152-2156は、組込み時に部分的に削除されたトランスジェン構成物からの膜結合ヒト γ -1の発現を報告している。彼らの結果は、3' BamH I部位が、5kb未満のV-Cイントロンを有する経膜再配列されそしてスイッチされた γ 遺伝子コピーを含む配列の輪郭となることを指摘している。従って、再配列されていないスイッチされていない遺伝子では、最初の γ -1定常エクソンの5'未満から5kb未満のところで始まる配列中にスイッチ領域全体が含まれる。従ってそれは5' 5.3kb Hind III断片中に含まれる (Ellison, J. W. ら (1982), Nucleic Acids Res., 10, 4071-4079)。Takahashiら (1982), Cell, 29, 671-679もまた、この断片がスイッチ配列を含むことを報告しており、この断片と7.7kb Hind III-BamH I断片とを合わせると我々がトランスジェン構成物に必要とする配列の全部を含むに違いない。

40 γ -1の第三エクソン (CH3) に特異的である次のオリゴヌクレオチドを使って、 γ -1領域を含むファージクローンを同定し単離する。

γ-1の第三エクソン(CH3)に特異的である次のオリゴヌクレオチドを使って、γ-1領域を含むファージクローンを同定し単離する。

pGIをBamH IとBgI IIで消化した後、子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理する。

図14からの断片 (a) および (b) を前記消化pGP1中にクローニングする。次いで5' BamH I部位がBamH I/Bgl II融合により破壊されるように置かれたクローンを単離する。それをpMUと命名する (図15参照)。pMUをBamH Iで消化し、図14からの断片 (c) を挿入する。Hind III消化により方向性を確認する。生じたプラミッドpH1G1 (図15) は、JおよびC μ セグメントをコードする1.8kb挿入断片を含有する。

51

52

5' TGA GCC ACG AAG ACC CTG AGG

TCA AGT TCA ACT GGT ACG TGG 3'

7.7kb Hind III-Bgl II断片 (図16中の断片 (a)) をHind III/Bgl IIで切断されたpREG3中にクローニングしてpREG1を作製する。上流の5.3kb Hind III断片 (図16中の断片 (b)) をHind III消化pREG1中にクローニングしてpREG2を作製する。BamH I/Spe I消化により正しい方向を確かめる。

F.C γ とC μ の結合

上述したプラスミドpHIG1はヒトJセグメントとC μ 定常領域エクソンを含む。C μ 定常領域遺伝子セグメントを含むトランスジェンを提供するために、pHIG1をSfi Iで消化した (図15)。プラスミドpREG2もSfi Iで消化し、ヒトC γ エクソンとラット3' エンハンサー配列を含む13.5kb挿入断片を得た。それらの配列を連結し、3.1.5kb挿入断片上にヒトJセグメント、ヒトC μ 定常領域、ヒトC γ 1定常領域およびラット3' エンハンサー配列を含むプラスミドpHIG3' を作製した (図17)。 *20

DXP1: 5' - TGG TAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TAT TAT
AAC CAC AGT GTC - 3'

DXP4: 5' - GCC TGA AAT GGA GCC TCA GGG CAC AGT GGG
CAC GGA CAC TGT - 3'

DN4: 5' - GCA GGG AGG ACA TGT TTA GGA TCT GAG GCC
GCA CCT GAC ACC - 3'

オリゴDXP1を使って同定されたファージクローンから、DLR1, DXP1, DXP' 1およびDA1を含む5.2kb Xho I断片 (図18中の断片 (b)) を単離する。

オリゴDXP4を使って同定されたファージクローンから、DXR4, DA4およびDXK4を含む3.2kb Xba I断片 (図18中の断片 (c)) を単離する。

図18中の断片 (b), (c) および (d) を結合し、pGP1のXba I/Xho I部位中にクローニングして、10.6kb挿入断片を含むpHIG2を形成せしめる。

このクローニングは連続的に行われる。まず、図18の5.2kb断片 (b) と図18の2.2kb断片 (d) を子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理し、そしてXho IとXba Iで消化されたpGP1中にクローニングする。生じたクローン 40 を該5.2kbおよび2.2kb挿入断片を用いてスクリーニングする。5.2kbおよび2.2kb挿入断片での試験に陽性である※

5' - GAT CCT GGT TTA GTT AAA GAG

GAT TTT ATT CAC CCC TGT GTC - 3'

を使って単離する。

再配列されていないVセグメントの制御地図を調べて、消化すると3' および5' 隣接配列と一緒に再配列されていないVセグメントを含む約2kbの長さを有するDNA断片を提供するユニーク制御部位を同定する。5' 開

* pCON1をSfi Iで消化し、そしてpREG2をSfi Iで消化して得られたヒトC γ 領域とラット3' エンハンサーとを含むSfi I断片と連結せしめることにより、ヒトC μ およびヒトC γ 1をコードするJセグメントを含まない第二のプラスミドを作製する。得られたプラスミドpCON 10 (図17) は、ヒトC μ 、ヒト1 γ およびラット3' エンハンサー配列を有する26kbのNot I/Spe I挿入断片を含む。

G.Dセグメントのクローニング

ヒトDセグメントをクローニングするための方策は図18に描写される。Dセグメントを含むヒトゲノムライブラリーからのファージクローンを、多様性領域配列 [Y. Ichihara (1988), *EMBO J.*, 7, 4141-4150] に特異的なプローブを使って同定しそして単離する。次のオリゴヌクレオチドを使用する。

※それらのクローンの半分が、BamH I消化により確かめると正しい方向で5.2kb挿入断片を有する。次いで図18の

30 3.2kb Xba I断片を、断片 (b) と (d) を含むこの中間プラスミド中にクローニングし、pHIG2を形成せしめる (図9)。このプラスミドは、ユニーク5' Sfi I部位とユニーク3' Spe I部位を有するポリリンカー中にクローニングされた多様性セグメントを含む。完全なポリリンカーはNot I部位により隣接される。

H. 重鎖小遺伝子座の作製

下記は、1または複数のVセグメントを含むヒト重鎖小遺伝子座の作製を説明する。

Newkirkら (1988), *J.Clin.Invest.*, 81, 1511-1518 のハイブリドーマ中に含まれるVセグメントとして同定されたものに相当する再配列されていないVセグメントを、次のオリゴヌクレオチド:

始配列はプロモーターおよび他の調節配列を含み、一方3' 隣接配列はV-DJ結合に必要な組換え配列を提供するだろう。この約3.0kbVセグメント挿入断片をpGB2のポリリンカー中にクローニングし、pVH1を形成せしめる。

pVH1をSfi Iで消化し、得られた断片をpHIG2のSfi I

部位にクローニングしてpHIG5' を作製する。pHIG2はDセグメントのみを含むので、生成したpHIG5' プラスミドはDセグメントと一緒に単一のVセグメントを含む。pHIG5' 中に含まれる挿入断片のサイズは、10.6kb+Vセグメント挿入断片のサイズである。

Not IとSpe Iでの消化によりpHIG5' から挿入断片を切り出す。J、C μ およびC γ 1セグメントを含むpHIG3' をSpe IとNot Iで消化し、そして上記配列とラット3' エンハンサーとを含む3kb断片を単離する。それらの2断片を一緒にして、Not Iで消化されたpGP1中に連結せしめ、Vセグメント、9つのDセグメント、6つの機能的なJセグメント、C μ 、C γ 1およびラット3' エンハンサーを含むpHIGを作製する。この挿入断片のサイズは約43kb+Vセグメント挿入断片のサイズである。

I. 相同組換えによる重鎖小遺伝子座の作製

前の章で指摘したように、pHIGの挿入断片は単一のVセグメントを使用すると約43~45kbである。この挿入断片サイズは、プラスミドベクター中に容易にクローニングすることができる限界かまたはそれに近い。より多数のVセグメントの使用に備えるために、接合子またはES細胞内での相同組換えによってラット3' エンハンサー配列、ヒトC μ 、ヒトC γ 1、ヒトJセグメント、ヒトCセグメントおよび多数のヒトVセグメントを含むトランスジェンを形成する、重複DNA断片の生体内相同組換えを下記に記載する。

ヒトJセグメントを含む6.3kb BamH I/Hind III断片(図14中の断片(a)を参照のこと)を、次のアダプター:

```

5' GAT CCA AGC AGT 3'
5' CTA GAC TGC TTG 3'
5' CGC GTC GAA CTA 3'
5' AGC TTA GTT CGA 3'

```

を使って、Mlu I/Spe Iで消化されたpHIG5' 中にクローニングする。

生成したプラスミドをpHIG5' 0 (重複)と命名する。このプラスミド中に含まれる挿入断片はヒトV、DおよびJセグメントを含む。pVH1からの単一Vセグメントが使われる時、この挿入断片のサイズは約17kb+2kbである。この挿入断片を単離し、そしてヒトJ、C μ 、 γ 1およびラット3' エンハンサー配列を含むpHIG3' からの挿入断片と組合わせる。両挿入断片は、2つのDNA断片の間の約6.3kbの重複部分を提供するヒトJ配列を含む。これらをマウス接合子中に同時注入すると、生体内相同組換えが起こり、pHIG中に含まれる挿入断片と同時のトランスジェンを生成する。

このアプローチは生体内で形成されるトランスジェン中への多数のVセグメントの付加を提供する。例えば、

単一のVセグメントをpHIG5' 中に組み込む代わりに、(1)単離されたゲノムDNA、(2)ゲノムDNAから誘導された連結DNA、または(3)合成VセグメントレパートリーをコードするDNAの上に含まれる多数のVセグメントをpHIG2のSfi I部位にクローニングしてpHIG5' V μ を作製する。次いで図14のJセグメント断片(a)をpHIG5' V μ 中にクローニングし、そして挿入断片を単離する。この挿入断片は、pHIG3' から単離した挿入断片上に含まれるJセグメントと重複するJセグメントと多数のVセグメントを含むようになる。これをマウス接合子の核中に同時注入すると、相同組換えが起こり、多数のVセグメントおよび多数のJセグメント、多数のDセグメント、C μ 領域、C γ 1領域(全てヒト由来)並びにラット3' エンハンサー配列をコードするトランスジェンを生成する。

J. 合成V μ 領域断片と重鎖DJC構成物との同時注入による重鎖小遺伝子座の作製

上述した通りに合成V μ 領域断片を作製しそして単離する。それらの断片を、プラスミドpHIG(または全くVセグメントを含まないpHIGの変形)の生成Not I挿入断片と一緒に同時注入する。同時注入されたDNA断片は染色体の単一部位に挿入される。生じたトランスジェニック動物の一部は、pHIG構成物中の前記配列の近隣に且つ上流に置かれた合成V領域を有するトランスジェン挿入断片を含むだろう。それらの動物は、実施例5(H)に記載の動物よりも多数のヒト重鎖一次レパートリーを有するであろう。

実施例6

軽鎖小遺伝子座の作製

30 A. pE μ 1の作製

pE μ 1の作製は図21に描写される。オリゴ:

5' GAA TGG GAG TGA GGC TCT CTC ATA CCC TAT TCA GA A CTG ACT 3' を使ってファージクローンから678bpのXba I-EcoR I断片 [J. Banerjiら (1983), *Cell*, 33, 729-740] においてマウス重鎖エンハンサーを単離する。

このE μ 断片を、EcoR I部位の平滑末端フィルインにより、EcoR V/Xba I消化されたpGP1中にクローニングする。生じたプラスミドをpE μ 1と命名する。

B. κ 軽鎖小遺伝子座の作製

κ 構成物は、少なくとも1つのヒトV κ セグメント、5つのヒトJ κ セグメント全部、ヒトJ-C κ エンハンサー、ヒト κ 定常領域エクソン、および理想的にはヒト3' κ エンハンサーを含む [K. Meyerら (1989), *EMBO J.*, 8, 1959-1964]。マウスの κ エンハンサーはC κ から9kb下流である。しかしながら、ヒトではまだ同定されていない。加えて、該構成物はマウス重鎖J-C μ エンハンサーの1コピーも含む。

この小遺伝子座は次の4つの成分断片から作製される:

(a) マウス遺伝子座との類推によりヒトC κ エクソン

55

と3' ヒトエンハンサーとを含む16kb Sma I断片 (図20中の断片 (a)) ;

(b) 5つのJセグメント全部を含む5' 隣接5kb Sma I断片 (図20中の断片 (b)) ;

(c) pEμ 1から単離されたマウス重鎖イントロンエンハンサー (この配列は、B細胞発達のできるだけ初期に軽鎖構成物の発現を誘導するために含まれる。重鎖遺伝子は軽鎖遺伝子よりも初期に転写されるため、この重鎖エンハンサーはおそらくイントロンκエンハンサーよりも早い段階で活性であろう。) ;および

(d) 1または複数のVセグメントを含む断片。

この構成物の調製は次の通りである。ヒト胎盤DNAをSma Iで消化し、電気泳動によりアガロース上で分画する。同様に、ヒト胎盤DNAをBamH Iで消化し、電気泳動 *

5' GAA CTG TGG CTG CAC CAT CTG TCT TCA TCT TCC CGC CAT CTG 3'

を用いて探査する。

CκがSma Iに隣接するように、16kb Xho I挿入断片をXho Iで切断されたpEμ 1中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpKap1と命名する。図22を参照のこと。

上記Cκ特異的オリゴヌクレオチドを用いてλ EMBL3 /BamH Iライブラリーを探査し、図20の断片 (d) に相当する11kbクローンを同定する。5kb Sma I断片 (図20の断片 (b)) をサブクローニングし、次いでSma Iで消化されたpKap1中に挿入する。正しい方向のJセグメント、CκおよびEμエンハンサーを含むそれらのプラスミドをpKap2と命名する。

その後、1または複数のVκセグメントをpKap2のMlu I中にサブクローニングし、ヒトVκセグメント、ヒトJκセグメント、ヒトCκセグメントおよびヒトEμエンハンサーをコードするプラスミドpKaphを生ぜしめる。pKaphをNot Iで消化することによりこの挿入断片を切り出し、そしてアガロースゲル電気泳動により精製する。こうして精製された挿入断片を上述の如くマウス接合子の前核中にマイクロインジェクトする。

C. 生体内相同組換えによるκ軽鎖小遺伝子座の作製

11kb BamH I断片 (図20の断片 (d)) を、その3' 末端がSfi I部位の方に向くように、BamH Iで消化されたpGP1中にクローニングする。生じたプラスミドをpKAP intと命名する。pKAPint中のBamH I部位とSpe I部位との間のポリリンカー中に1または複数のVκセグメントを挿入してpKaphVを作製する。pKaphVの挿入断片をNot Iでの消化により切り出し、そして精製する。pKap2からの挿入断片をNot Iでの消化により切り出し、精製する。それらの2断片の各々は、pKaphVからの断片が、pKap2から得られる挿入断片に含まれる5kb Sma I断片と実質的に相同であるJκセグメントを含む5kbのDNA配列を含むという点で、相同性領域を含有する。それ故に、それらの挿入断片は、マウス接合子中にマイクロインジ

56

*により分画する。Sma Iで消化したゲル16kb画分を単離し、同様にBamH Iで消化したDNAを含むゲルから11kb領域を単離する。

16kb Sma I画分を、Xho Iで消化されXho I制限消化生成物をフィルインするためにクレノウ断片DNAポリメラーゼで処理されているラムダFIX II (Stratagene, La Jolla, California) 中にクローニングする。16kb Sma I画分の連結はSma I部位を破壊するがXho I部位はそのまま残す。

10 11kb BamH I画分を、クローニング前にBamH Iで消化したラムダEMBL3 (Stratagene, La Jolla, California) 中にクローニングする。

各ライブラリーからのクローンを、Cκ特異的オリゴ :

エクトされると相同組換えして、Vκ、JκおよびCκをコードするトランスジェンを形成することができる。

D. 軽鎖JC構成物と合成Vκ領域断片との同時注入によるκ軽鎖小遺伝子座の作製

上記の如く合成Vκ領域断片を作製し、単離する。それらのDNA断片をプラスミドpKap2またはプラスミドpKaphの精製Not I断片と同時注入する。同時注入されたDNA断片は染色体の単一部位に挿入される。生成するトランスジェニック動物の一部は、pKap2またはpKaph構成物の該配列の近隣で且つ上流に置かれた合成V領域を有するトランスジェン挿入断片を含むだろう。それらの動物は実施例6 (B) に記載のものよりも多数のヒトκ軽鎖一次レパートリーを有するだろう。

実施例7

免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子の再配列され発現されるコピーに相当するゲノムクローンの単離

この実施例は、着目の免疫グロブリンを発現する培養細胞からの免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子のクローニングを記載する。そのような細胞は、与えられた免疫グロブリン遺伝子の多数の対立遺伝子を含み得る。例えば、ハイブリドーマは4コピーのκ軽鎖遺伝子を含み、その2コピーは着目の免疫グロブリンを発現するもとのB細胞からのものである。それらの4コピーのうち、数個が再配列することができるという事実にもかかわらず、ただ1つだけが着目の免疫グロブリンをコードする。この実施例に記載の手順は、κ軽鎖の発現コピーの選択的クローニングを考慮したものである。

A. 二本鎖cDNA

ヒトハイブリドーマもしくはリンパ腫からの細胞、または細胞表面形態もしくは分泌形態またはその両形態のκ軽鎖含有IgMを合成する他の細胞系を、ポリA⁺RNAの単離に使用する。次いで該RNAを、逆転写酵素を使ったオリゴdT開始cDNAの合成に使用する。次いで一本鎖cDNAを

57

単離し、ポリヌクレオチドターミナルトランスフェラーゼ酵素を使って3'末端にG残基を付加する。次いでG*

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG CCC CCC CCC CCC - 3'

を使った第二鎖合成 (DNAポリメラーゼ酵素により触媒される) のための鋳型として用いる。

二本鎖cDNAを単離し、発現される免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖をコードするmRNAの5'末端のヌクレオチド配列を決定するために使用する。次いで、それらの発現される遺伝子のゲノムクローンを単離する。発現※10

5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG TCA TCA GAT

GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA - 3'

を使った第3巡目のDNA合成のための鋳型として使用する。

このプライマーは、κ軽鎖情報の定常部分に特異的な配列 (TCA TCA GAT GGC GGG AAG TAG AAG ACA GAT GGT ★

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'

5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG - 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。

PCR増幅された配列をゲル電気泳動により精製し、そ ☆

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'

を使うジデオキシ配列決定反応のための鋳型として使用する。

次いで、該配列の最初の42ヌクレオチドを使って、免疫グロブリン情報が転写された遺伝子を単離するためのユニークプローブを合成する。このDNAの合成42ヌクレオチドセグメントを、以後○-カッパと称することにする。 30

Ig発現細胞系から単離しそして個別におよびSma Iを含む幾つかの異なる制限エンドヌクレアーゼと対に組み合わせて消化したDNAのサザンプロットを、³²P標識したユニークオリゴヌクレオチド○-カッパを用いて探査する。ユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位は、再配列されたVセグメントの上流に同定される。

次いでIg発現細胞系からのDNAをSma Iおよび第2の酵素 (Vセグメントの内側にSma I部位がある場合にはBam H IまたはKpn I) で切断する。いずれかの生成した非平 40滑末端をT4 DNAポリメラーゼ酵素で処理し、平滑末端化DNA分子を与える。次いで制限部位をコードするリンカー (断片中にどの部位が存在しないかに応じてBamH I, EcoR IまたはXho I) を付加し、そして対応するリンカー◆

5' - GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG ACA GGA GAC

GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC - 3'

を使った3巡目のDNA合成のための鋳型として使用する。

このプライマーは、μ重鎖情報の定常部分に特異的な 50

58

*末端が付けられた一本鎖cDNAを精製し、そしてプライマーとして次のオリゴヌクレチオド:

※される軽鎖遺伝子のクローニング方法は、下記のB部に要約される。

B. 軽鎖

A部に記載された二本鎖cDNAを変性せしめ、次のオリゴヌクレオチドプライマー:

★GCA) 並びに新たに合成されるDNA鎖のPCR増幅のためのプライマーとして使うことができるユニーク配列 (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG) を含む。この配列を、次の2つのオリゴヌクレオチドプライマー:

☆してプライマーとして次のオリゴヌクレオチド:

◆酵素で切断してBamH I, EcoR IまたはXho I末端を有するDNA断片を与える。次いで該DNAをアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画し、発現されるVセグメントを包含するDNA断片を含む画分をラムダEMBL3またはラムダFIX (Stratagene, La Jolla, California) 中にクローニングする。ユニークプローブ○-カッパを使って、Vセグメント含有クローンを単離する。陽性クローンからDNAを単離し、そしてpKap1のポリリンカー中にサブクローニングする。生じたクローンをpRKLと命名する。

実施例8

免疫グロブリン重鎖μ遺伝子の再配列され発現されるコピーに相当するゲノムクローンの単離

この実施例は、着目の免疫グロブリンを発現する培養細胞からの免疫グロブリン重鎖μ遺伝子のクローニングを記載する。この実施例に記載の手順は、μ重鎖遺伝子の発現コピーの選択的クローニングを考慮したものである。

実施例7のA部に記載した如く、二本鎖cDNAを調製し単離する。この二本鎖cDNAを変性せしめ、次のオリゴヌクレオチドプライマー:

配列 (ACA GGA GAC GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC) 並びに新たに合成されるDNA鎖のPCR増幅のためのプライマーとして使うことができるユニーク配列 (GTA

CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG)を含む。この配列を、* *次の2つのオリゴヌクレオチドプライマー:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'

5' - GTA CTC CAT ATC AGC TGG ATG AAG - 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。

※してプライマーとして次のオリゴヌクレオチド:

PCR増幅された配列をゲル電気泳動により精製し、そ※

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'

を使ったジデオキシ配列決定反応のための鋳型として使用する。

次いで、該配列の最初の42ヌクレオチドを使って、免疫グロブリン情報が転写された遺伝子を単離するためのユニークプローブを合成する。このDNAの合成42ヌクレオチドセグメントを、以後o-mi-yuと称することにする。

Ig発現細胞系から単離しそして個別におよにMlu I (Mlu Iは、JセグメントとμCH1との間を開裂する稀少切断酵素である)を含む幾つかの異なる制限エンドヌクレアーゼと対に組み合わせ消化したDNAのサザンブロットを、³²P標識したユニークオリゴヌクレオチドo-mi-yuを用いて探査する。ユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位は、再配列されたVセグメントの上流に同定される。

次いでIg発現細胞系からのDNAをMlu Iおよび第2の酵素で切断する。次いでMlu IまたはSpe Iアダプターリンカーを末端に連結せしめ、切断して上部部位をMlu IまたはSpe Iに変換する。次いで該DNAをアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画し、発現される部位セグメントを包含するDNA断片を含む画分をプラスミドpGP1中に直接クローニングする。ユニークプローブo-mi-yuを使30

ってVセグメント含有クローンを単離し、その挿入断片をMlu IまたはMlu I/Spe Iで切断されたプラスミドpC★

5' - GGT CTA TGA TAG TGT GAC TAC TTT GAC TAC

TGG GGC CAA GGC - 3'

を使ってマウスゲノムクローンを単離する。

陽性のファージクローンから誘導されたDNAから、このプローブとハイブリダイズする3.5kb Kpn I-EcoR I断片を単離する。この断片をKpn I/EcoR Iで消化されたpGP1d1中にサブクローニングし、プラスミドpMK01を形成せしめる。

次のようにして、組換え体の薬剤選択のためのネオマイシン耐性 (Neo) 遺伝子および単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子 (M. Capecchi (1989), *Science*, 244, 1288-1292) を単離する。プラスミドpGEM7 (KJ1) (M. A. Rudnicki, 3/15/89) をHind IIIで消化し、そしてDNA pol Iのクレノウ形で末端を平滑化する。次いで該DNAをEcoR Iで消化してpGKNeo断片を単離し、次のオリゴヌクレオチド:

5' - AATTCATG - 3'

をアダプターとして使って、Sph I/Nae Iで切断されたpMK01中にクローニングする。

40 生じたプラスミドをpMK02と命名する。このプラスミドは、マウスJ_Hセグメントを隣接する配列により隣接されたネオマイシン耐性遺伝子を含む。このプラスミドを単独で重鎖遺伝子の欠失に使うことができる。あるいは、ヘルペスTK遺伝子を該構成物に付加して、Neo耐性クローニングにおける相同組換え現象の頻度を向上させることができる [M. Capecchi (1989), *Science*, 244, 1288-1292]。これは次のようにして行われる。pGEM7 (TK) (M. A. Rudnicki) のEcoR I-Hind III PGKTK断片を単離し、そしてアダプターとして次のオリゴヌクレオチ

50 D:

★ON2中にサブクローニングする。生じたクローンをpRMGH 10 と命名する。

実施例9

相同組換えによるマウス重鎖遺伝子の欠失

この実施例は、胚性幹 (ES) 細胞中での相同組換え [Zijlstraら (1989), *Nature*, 342, 435-438] による内因性マウス重鎖遺伝子の欠失に次いで、生成したキメラマウスの生殖細胞にES細胞が移住するようにそれらのES細胞をマウス胚盤胞胚中に移植すること (Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E. J. Robertson編, IRL Press, Washington, D. C., 1987) を記載する。

重鎖Jセグメントを欠失せしめ、よって重鎖遺伝子座における好結果の遺伝子再配列の可能性を排除するようにマウス染色体中に相同に組み換わるであろうDNA配列を作製する。この構成物のデザインを下記に要約する。

プラスミドpGP1を制限エンドヌクレアーゼBamH IおよびBgl IIで消化し、そして再連結せしめてプラスミドpGP1d1を得る。次いでこのプラスミドを使っていわゆる遺伝子破壊 (ノックアウト) 構成物を構築する。

マウスゲノムの所望の標的領域に相同な配列を得るために、非リンパ系組織 (例えば肝臓) から誘導されたファージライブラリーから、次のJ_H特異的オリゴヌクレオチドプローブ:

61

5' - AATTGTAC - 3'

5' - AGCTGTAC - 3'

を使ってpMK02のKpn I部位にクローニングする。生じた*

5' - GCA TCC TGG AAG GTT CAG ATG AAT ACC

TTG TAT GCA AAA TCC - 3'

とハイブリダイズする13kb EcoR I断片を使う。

C μ コードエクソンを含むこの12kb断片、または5' EcoR I末端を含む該断片を実質的部分を、マウスゲノム 10 フェージライブラリーから単離し、そしてpMK03のEcoR I部位中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpMK04と命名する。

pMK04の挿入断片をNot Iでの消化により単離し、次いでES細胞中にエレクトロポレーションする。相同組換え体クローンを単離し、Zijlstraら (1989), *Nature*, 342, 435-438により記載された通りにJ μ 欠失マウスの作製に使用する。

実施例10

相同組換えによるマウス軽鎖遺伝子の欠失

この実施例は、胚性幹細胞中での相同組換えによる内因性マウス軽鎖遺伝子の欠失を記載する (前記実施例を参照のこと)。

5' - GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT

CTT CCC ACC ATC CAG - 3'

を使ってマウスゲノムクローンを単離する。

陽性のクローンからDNAを単離し、そして α -MK3プローブとハイブリダイズする2.3kb Bgl II断片 [P.S. Neum \times 30

5' - CAT TCT GCG TAT GAA CAG CCC ACC TAT

CAA AGG TTA CAT TAG - 3'

この2.3kb Bgl II断片を、該断片の3'末端がポリリンカー部位に隣接するように、BamH Iで消化されたpKKO 1中にサブクローニングする。

オリゴヌクレオチド α -MKCとハイブリダイズする4kb Sph I-Hpa I-DNA断片を陽性フェージクローンから単離し、そしてEcoR I/Spa Iで消化されたプラスミドpKKO 2中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpKK03と命名する。

pGEM7 (KJ1) Sal (M. A. Rudnicki, 3/15/89) の2kb Sal I-EcoR I断片を単離し、リンカーアダプターを使ってプラスミドpKK03のBssH II部位中にサブクローニングする。これは、まず次の3つのオリゴヌクレオチド:

62

*プラスミドをpMK03と命名する。

相同組換えの全体効率を更に向上させるために、標的配列に相同であるDNAの大セグメントを構成物に付加する。下記のC μ 特異的オリゴヌクレオチド

5' - AATTTTG - 3'

を使って、BamH I/Sfi Iで消化されたpGP1中にサブクローニングする。生じたプラスミドをpKK01と命名する。

マウスゲノムの所望の標的領域に相同な配列を得るために、非リンパ系組織 (例えば肝臓) から誘導されたフェージライブラリーから、 α -MKCと命名された次のマウス κ 軽鎖特異的オリゴヌクレオチド:

5' - CAGCGCGC - 3'

5' - GATCGCGCGCTG - 3'

5' - AATTGCGCGCTG - 3'

の混合物を2kb Sal I-EcoR I断片に連結せしめることによって行われる。次いでこの連結混合物を酵素BssH Iで消化し、そしてBssH IIで消化されたプラスミドpKKO 3に連結せしめる。生じたプラスミドをpKK04と命名する。

pKK04の挿入断片をNot Iでの消化により単離し、次いでES細胞中にエレクトロポレーションする。相同組換え体クローンに単離し、Zijlstraら (1989), *Nature*, 342, 435-438により記載された通りにC κ 欠失マウスの作製に使用する。

50 実施例11

相同組換えによるマウス κ 軽鎖遺伝子の不活性化

この実施例は、胚性幹 (ES) 細胞中での相同組換えによるマウス内因性 κ 遺伝子座の不活性化に次いで、不活性化された κ 対立遺伝子を有する標的ES細胞を初期マウス胚 (胚盤胞) 中に注入することによるマウス生殖細胞系中への変異遺伝子の導入を記載する。

方策は、J κ 遺伝子と C κ セグメントに及ぶ遺伝子座の4.5kbセグメントが欠失されそして選択マーカーneoにより置き換えられているマウス κ 遺伝子座に相同なDNA配列を含むベクターを用いた相同組換えにより J κ 遺伝子と C κ 遺伝子を欠失せしめることである。

κ 標的ベクターの作製

プラスミド pGEM7 (KJ1) (M. A. Rudnicki, Whitehead Institute) は、クローニングベクター pGEM-72f (+) *

5' - GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT

ATC CAT CTT CCC ACC ATC CAG - 3'

および J κ 遺伝子セグメントに特異的なオリゴヌクレ※ ※オチドプローブ:

5' - CTC ACC TTC GGT GCT GGG ACC

AAG CTG GAG CTG AAA CGT AAG - 3'

を使って、肝臓DNAから誘導されたゲノムファージライブラリーから、マウス κ 鎖配列 (図25a) を単離した。

陽性ファージクローンから2断片において、即ち1.2kb Bgl II/Sac I断片と6.8kb Sac I断片として、マウス C κ セグメントの3' に及び8kb Bgl II/Sac I断片を単離し、それをBgl II/Sac Iで消化されたpGEM (KJ1) 中にサブクローニングし、プラスミド pNEO-K3' を作製した (図25b)。

J κ 領域の5' に及び1.2kb EcoR I/Sph I断片も陽性ファージクローンから単離した。この断片のSph I部位にSph I/Xba I/Bgl II/EcoR Iアダプターを連結せしめ、生じたEcoR I断片をneo遺伝子および下流の3' κ 配列と同じ5' → 3' 方向で、EcoR Iで消化されたpNEO-K3' に連結せしめ、pNEO-K5' 3' (図25c) を作製した。

次いで、Mansourら [(1988) *Nature*, 336, 348-352] により記載されたようにして、相同組換え体を有するESクローンの富化に備えるために、該構成物中に単純ヘルペスウイルス (HSV) チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子を含めた。プラスミド pGEM7 (TK) (M. A. Rudnicki) からHSV TKカセットを得た。このカセットは、pGEM7 (KJ1) について上述したのと同様に、マウスpgkプロモーターとポリアデニル化配列とにより隣接されたHSV TK遺伝子の構造配列を含む。pGEM7 (TK) のEcoR I部位をBamH I部位に変更し、そしてTKカセットをBamH I/Hind III断片として切り出し、pGP1b中にサブクローニングしてp1GPb-TKを作製した。このプラスミドをXho I部位のところで線状化し、J κ の5' からのゲノム配列とC κ の3' からのゲノム配列とにより隣接されたneo遺伝子を

* 中のマウスホスホグリセレートキナーゼ (pgk) プロモーター [Xba I/I/Taq I断片; Adra, C. N. ら (1987), *Gen* e, 60, 65-74] の転写調節下に、トランスフェクトされたES細胞の薬剤選択に使うネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を含む。このプラスミドは、マウスpgk遺伝子の3' 領域に由来する、neo遺伝子にとって異種のポリアデニル化部位 [Pvu II/Hind III断片; Bore, P. H. ら (1990) *Biochemical Genetics*, 28, 299-308] も含む。このプラスミドを κ 標的ベクターの作製のための出発点として使った。第一段階はneo発現カセットの3' の κ 遺伝子座に相同な配列を挿入することであった。

C κ 遺伝子座に特異的なオリゴヌクレオチドプローブ:

含む、pNEO-K5' 3' からのXho I断片をpGP1b-TK中に挿入し、標的ベクターJ/C KI (図25d) を作製した。J/C KIを用いた相同組換え後のゲノム κ 遺伝子座の推定構造を図25eに示す。

κ 対立遺伝子の標的不活性化によるES細胞の作製および分析

本質的には記載された通りに [Robertson, E. J. (1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson編 (Oxford: IRL Press), 71-112頁]。分裂上不活性なSNL76/7支持細胞層 [McMahon, A. P. およびBradley, A. (1990) *Cell*, 62, 1073-1085] 上でAB-1細胞を増殖させた。

κ 鎖不活性化ベクターJ/C KIをNot Iで消化し、そして記載された方法 [Hasty, R. P. ら (1991) *Nature*, 350, 243-246] によりAB-1細胞中にエレクトロポレートせしめた。エレクトロポレートされた細胞を100mm皿上に2~5×10⁶細胞/皿の密度で塗抹した。24時間後、G418 (200 μ g/mlの活性成分) およびFIAU (0.5 μ M) を培地に添加し、10~11日に渡り薬剤耐性クローンを発達させた。クローンを採取し、トリプシン処理し、2部分に分け、更に増殖させた。次いで、各クローンからの細胞の半分を凍結させ、もう半分をベクターと標的配列との間の相同組換えについて分析した。

サザンプロットハイブリダイゼーションによりDNA分析を行った。記載の如く [Laird, P. W. ら (1991), *Nuc l. Acids Res.*, 19] クローンからDNAを単離し、Xba Iで消化し、そして特徴的プローブとして図25eに指摘の800 bp EcoR I/Xba I断片を用いて探査した。このプローブは野生型遺伝子座中の3.7kb Xba I断片、および標的ベ

クターと相同組換えされた遺伝子座中の特徴的1.8kbバンドを検出した(図25aおよびeを参照のこと)。サザンブロット分析によりスクリーニングした358個のG418およびFIAU耐性クローンのうち、4つのクローンがκ遺伝子座での相同組換えを示す1.8kb Xba Iバンドを表した。それらの4つのクローンを更にBgl II, Sac IおよびPst I酵素で消化し、κ対立遺伝子のうちの1つに該ベクターが相同的に組み込まれたことを確認した。特徴的800 bp EcoR I/Xba I断片を用いて探査すると、野生型DNAのBgl II, Sac IおよびPst I消化物がそれぞれ4.1, 5.4 および7kbの断片を生成し、一方標的されたκ対立遺伝子の存在はそれぞれ2.4, 7.5および5.7kbの断片により指摘された(図25aおよびeを参照のこと)。Xba I消化物により検出された4つの陽性クローンの全てが、κ軽鎖のどこでの相同組換えに特徴的な期待のBgl II, Sac IおよびPst I制限断片を示した。

不活性化されたκ鎖を有するマウスの作製

前の章で記載した4つの標的されたESクローンを、記載の如く [Bradley, A. (1987), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson編 (Oxford: IRL Press), 115-151頁] C57BL/6J胚盤胞中に注入し、そして偽妊娠雌の子宮に移し、注入ES細胞から誘導された細胞と宿主の胚盤胞との混合物を*

5' - ACT ATG CTA TGG ACT ACT GGG GTC AAG GAA CCT CAG TCA CC

G - 3'

を使って、D3 ES細胞系 [Gosslerら (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, 9065-9069] から誘導されたゲノムライブラリーから、J_H領域を含むマウス重鎖配列(図26a)を単離した。

J_H領域に及ぶ3.5kbゲノムSac I/Stu I断片を陽性ファージクローンから単離し、それをSca I/Sma Iで消化されたpuc18中にサブクローニングした。生じたプラスミドをpuc18 J_Hと命名した。プラスミドpGEM7 (KJ1) から、トランスフェクトされたES細胞の薬剤選別に用いるネオマイシン耐性遺伝子(neo)を誘導した。pGEM (KJ ※

5' - GGC CGC TCG ACG ATA GCC TCG AGG CTA TAA ATC TAG AAG AA

T TCC AGC AAA GCT TTG GC - 3'

と連結せしめた。

生じたプラスミド(pGETと命名)を使ってマウス免疫グロブリン重鎖標的構成物を構築した。

Mansourら [(1988) *Nature*, 336, 348-352] により記載されたようにして、相同組換え体を有するESクローンの富化に備えるために、該構成物中に単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含めた。プラスミドpGEM (TK) からEcoR IとHind IIIでの消化によりHSV TK遺伝子を得た。このTK DNA断片をpGMTのEcoR I部位とHind III部位との間にサブクローニングし、プラスミドpGMT-TK (図26c)を作製した。

*表すキメラマウスを作製する。黒いC57BL/6J背景上におけるES細胞系に由来するアグーチ皮膜着色の存在により、キメラ動物を外観的に同定する。AB1 ES細胞はXY細胞系であるので、雄のキメラをC57BL/6Jと交配させ、子孫を優性のアグーチ皮膜色の存在について観察する。アグーチ子孫はESゲノムの生殖細胞伝達の指標である。κ鎖不活性化についてのアグーチ子孫の異型接合性は、標的されたESクローンの同定に用いた特徴的プローブを使って、尾部生検試料からのDNAのサザンブロット分析により確かめる。次いで、異型接合体の兄弟-姉妹交配を行い、κ鎖変異に対して同型接合性のマウスを生成せしめる。

実施例12

相同組換えによるマウス重鎖遺伝子の不活性化

この実施例は、胚性幹(ES)細胞中での相同組換えによる内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子の活性化を記載する。方策は、J_H領域が欠失されそして選択マーカー遺伝子neoにより置き換えられている重鎖配列を含むベクターとの相同組換えにより内因性重鎖Jセグメントを欠失せしめることである。

重鎖標的のベクターの作製

J_H4特異的オリゴヌクレオチドプローブ:

※1) 中のHind III部位を合成アダプターの付加によってSal I部位に変更し、そしてXba I/Sal Iでの消化によりneo発現カセットを切り出した。次いでneo断片の両端をDNA pol Iのクレノウ形での処理により平滑末端化し、puc18 J_HのNae I部位中にサブクローニングし、プラスミドpuc18 J_H-neo (図26b)を作製した。

標的ベクターの更なる作製は、プラスミドpGPIbの誘導体において行った。pGPIbを制限酵素Not Iで消化し、アダプターとして次のオリゴヌクレオチド:

40 標的配列に対する広範な相同性領域を提供するために、陽性ゲノムファージクローンからXho IでのDNAの限定消化およびXba Iでの部分消化により、J_H領域の5'に位置する5.9kbのゲノムXba I/Xho I断片を誘導した。図26aと26bに示されるように、このXba I部位はゲノムDNA中には存在せず、むしろ陽性ファージクローン中のクローン化ゲノム重鎖挿入断片にすぐに隣接するファージ配列から誘導される。この断片をXba I/Xho Iで消化されたpGMT-TK中にサブクローニングし、プラスミドpGMT-TK-J_H5' (図26d)を作製した。

50 作製の最終段階は、neo遺伝子および隣接するゲノム

配列を含むpuc18 J_H-neoからの3kb EcoR I断片の切除を含んだ。この断片をクレノウポリメラーゼにより平滑末端にし、同様に平滑末端化されたpGMT-TK-J_H5' のXho I部位中にサブクローニングした。生じた構成物J_HKO1 (図26e) は、J_H遺伝子座を隣接する6.9kbのゲノム配列を含み、neo遺伝子が中に挿入されているJ_H領域に及ぶ2.3kbの欠失を有する。図25fは、標的用構成物との相同組換え後の内因性重鎖対立遺伝子の構造を示す。

実施例13

標的されたES細胞の生産および分析

本質的に記載された通りに [Robertson, E. J. (1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson編 (Oxford: IRL Press), 71-112頁]、分裂上不活性なSNL76/7支持細胞層 [McMahon, A. P. およびBradley, A. (1990) *Cell*, 62, 1073-1085] 上でAB-1細胞を増殖させた。

重鎖不活性化ベクターJ_HKO1をNot Iで消化し、そして記載された方法 [Hasty, P. R. ら (1991) *Nature*, 350, 243-246] によりAB-1細胞中にエレクトロポレートせしめた。エレクトロポレートされた細胞を100mm皿上に2 × 10⁶細胞/皿の密度で塗抹した。24時間後、G418 (200mg/mlの活性成分) およびFIAU (0.5mM) を培地に添加し、8~10日間に渡り薬剤耐性クローンを発達させ*

オリゴ-42 5' - caa gag ccc gcc taa tga gcg ggc ttt ttt
ttg cat act gcg gcc gct - 3'

オリゴ-43 5' - aat tag cgg ccg cag tat gca aaa aaa agc
ccg ctc att agg cgg gct - 3'

と連結せしめた。

生じたプラスミドpGP1aを、稀少切断性制限酵素Not Iにより切除することができる非常に大型のDNA構成物をクローニングするために改変する。それは、trpA遺伝子に由来する強力な転写終結シグナル [Christie, G. E. ら (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4180] の下流に (アンピシリン耐性遺伝子Amp^Rに関して) Not I制限部位を含む。この終結シグナルは、Amp^R遺伝子からの読み過ぎして転写を排除することにより、Not I部位中に挿

オリゴ-47 5' - ggc cgc aag ctt act gct gga tcc tta att
aat cga tag tga tct cga ggc - 3'

オリゴ-43 5' - ggc cgc ctc gag atc act atc gat taa tta
agg atc cag cag taa gct tgc - 3'

と連結せしめた。

生じたプラスミドpGP1bは、Not Iにより隣接された短いポリリンカー領域を含む。これは、Not Iにより切除

*た。クローンを採取し、トリプシン処理し、2部分に分け、更に増殖させた。次いで、各クローンからの細胞の半分を凍結させ、もう半分をベクターと標的配列との間の相同組換えについて分析した。

サザンブロットハイブリダイゼーションによりDNA分析を行った。記載の如く [Laird, P. W. ら (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19] クローンからDNAを単離し、Hind IIIで消化し、そして特徴的プローブとして図25fに示される500 bp EcoR I/Stu I断片を用いて探査した。このプローブは野生型遺伝子座中の2.3kb Hind III断片を検出し、一方で5.3kbバンドは標的用ベクターと相同組換えされた標的遺伝子座に特徴的である (図26aおよびfを参照のこと)。重鎖対立遺伝子の標的破壊を確かめるために酵素Spe I, Stu IおよびBamH Iで追加の消化を行った。

実施例14

重鎖小遺伝子座トランスジェン

A. 大型のDNA配列をクローニングするためのプラスミドベクターの作製

1. pGP1a

プラスミドpBR322をEcoR IとSty Iで消化し、そして次のオリゴヌクレオチド:

※入されるコード配列の潜在的毒性を低下させる。加えて、このプラスミドは、pBR322コピー数調節領域を保持しているためにpUCプラスミドに比較して低コピー数である。この低コピー数も挿入配列の潜在的毒性を更に低下させ、そしてDNA複製による大型挿入断片に対する選択を減少させる。

2. pGP1b

pGP1aをNot Iで消化し、そして次のオリゴヌクレオチド:

することができる大型挿入断片の作製を容易にする。

3. pGPe

次のオリゴヌクレオチド:

69

70

オリゴ-44 5' - ctc cag gat cca gat atc agt acc tga aac
agg gct tgc - 3'

オリゴ-45 5' - ctc gag cat gca cag gac ctg gag cac aca
cag cct tcc - 3'

を使って、ポリメラーゼ連鎖反応技術によりラット肝臓
DNA由来の免疫グロブリン重鎖3' エンハンサー (S. Pet
tersenら (1990), *Nature*, 344, 165-168) を増幅せし 10
めた。

増幅生成物をBamH IとSph Iで消化し、そしてBamH I/
Sph Iで消化されたpNN03 (pNN03は、記載順に次の制限
部位: Not I, BamH I, Nco I, Cla I, EcoRV, Xba I, Sac I, Xh
o I, Sph I, Pst I, Bgl II, EcoR I, Sma I, Kpn I, Hind III
およびNot Iを有するポリリンカーを含むpUC由来のプラ

スミドである) 中にクローニングした。生じたプラスミ
ドpRE3をBamH IとHind IIIで消化し、そしてラットIg重
鎖3' エンハンサーを含む挿入断片を、BamH I/Hind II
Iで消化されたpGP1b中にクローニングした。生じたプラ
スミドpGPe (図27および表1) は、配列をクローニング
することができそして次いでNot I消化によって3' エ
ンハンサーと一緒に切り出すことができる幾つかのユニ
ーク制限部位を含有する。

表1 ベクター pGPe の配列

tct ggg gcc aag- 3'

を用いてスクリーニングし、そしてファージクローンλ 1.3を単離した。6つのJセグメント全部並びにDセグメントDHQ52および重鎖J-μイントロンエンハンサー *

オリゴ-2 5' - cac caa gtt gac ctg cct ggt cac aga cct
gac cac cta tga- 3'

を用いてスクリーニングし、ファージクローンλ 2.1を単離した。μ スイッチ領域およびμ 定常領域エクソンの全部を含む、10.5kbのHind III/Xho I断片をこのクローンから単離した。それらの2断片を、Kpn I/Xho Iで消化したpNN03と一緒に連結せしめ、プラスミドpJM1を得た。

2. pJM2

ファージクローンλ 2.1から4kbのXho I断片を単離した。該断片は、ある種のIgD発現B細胞中でのμ 欠失に関係するいわゆるΣ μ 要素 (H. Yasuiら (1989) *Eur. J. Immunol.*, 19, 1399) を含む、pJM1の配列のすぐ下流の配列

オリゴ-4 5' - tgg tat tac tat ggt tgg ggg agt tat tat
aac cac agt gtc- 3'

を用いて、ヒト胎盤ゲノムライブラリーをD領域クローンについてスクリーニングした。ファージクローンλ 4.1とλ 4.3を単離した。D要素D_{K1}, D_{K2}およびD_{M2} (Y. Ichiharaら (1988) *EMBO J.*, 7, 4141) を含む5.5kbのXho I断片をファージクローンλ 4.1から単離した。D要素D_{LR1}, D_{XP1}, D_{XP2} およびD_{A1}を含む上流の隣接5.2kb Xho I断片をファージクローンλ 4.3から単離した。それらのD領域Xho I断片の各々をプラスミドベクターpSP72 (Pr omega, Madison, WI) のSal I部位中にクローニングし、2配列を結合するXho I部位を破壊した。次いで上流断片をXho IとSma Iで切り出し、下流断片をEcoRVとXho Iで切り出した。得られた単離断片をSal Iで消化されたpSP2と一緒に連結せしめ、プラスミドpDH1を与えた。pDH1は、少なくとも7つのDセグメントを含むXho I (5') およびEcoRV (3') で切り出すことができる10.6kbの挿入断片を含有する。

4. pCOR1

プラスミドpJM2をAsp718 (Kpn Iのアイソシゾマー) で消化し、そしてDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて突出末端をフィルインした。次いで生じたDNAをCla Iで消化し、挿入断片を単離した。この挿入断片をpDH1のXho I/EcoRV挿入断片およびXho I/Cla I消化pGPeと連結せしめ、pCOR1を作製した (図29)。

オリゴ-29 5' - cag cag gtg cac acc caa tgc cca tga gcc
cag aca ctg gac- 3'

を用いてヒトゲノムライブラリーをスクリーニングし 50 た。ファージクローンλ 29.4とλ 29.5を単離した。γ ス

*を含む、6kbのHind III/Kpn I断片をこのクローンから単離した。同じライブラリーをヒトμ 特異的オリゴヌクレオチド:

※列を含有する。この断片をDNAポリメラーゼIのクレノウ断片で処理し、そしてXho Iで切断されクレノウで処理されたpJM1と連結せしめる。生じたプラスミドpJM2 (図28) は、内部のXho I部位を失っているが、クレノウ酵素による不完全な反応の結果として3' Xho Iを保持している。pJM2は完全なヒトJ領域、重鎖J-μ イントロンエンハンサー、μ スイッチ領域およびμ 定常領域エクソン全部、並びにμ 欠失に関する2つの0.4kbの直接反復σ μ およびΣ μ を含有する。

3. D領域クローンの単離およびpDH1の作製

次のヒトD領域特異的オリゴヌクレオチド:

★5. pVH251

2つのヒト重鎖可変領域セグメントV_H251とV_H105 [C. G. Humphriesら (1988) *Nature*, 331, 446] を含む10.3kbのゲノムHind III断片をpSP72中にサブクローニングし、プラスミドpVH251を与えた。

6. pIGM1

プラスミドpCOR1をXho Iで部分消化し、そしてpVH251の単離Xho I/Sal I挿入断片を上流のXho I部位にクローニングし、プラスミドpIGM1 (図30) を作製した。pIGM1は、下記の配列要素の全部がNot Iでの消化によりベクター配列を含まない単一断片において単離することができ、そしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトすることができるように、2つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのヒトDセグメント、6つのヒトJ_Hセグメント全部、ヒトJ-μ エンハンサー、ヒトσ μ 要素、ヒトμ スイッチ領域、ヒトμ コードエクソン全部およびヒトΣ μ 要素を、ラット重鎖3' エンハンサーと共に含有する。

C. IgMとIgGを発現する小遺伝子座トランスジェン pHCl の作製

1. γ 定常領域クローンの単離

次のヒトIgG定常領域遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド:

75

イッチ領域を含むファージクローンλ29.4の4kb Hind I II断片を使って、ファージベクターラムダFIX™ II (Stratagene, La Jolla, CA) 中にクローニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを探索した。ファージクロー *

オリゴ-67 5' - tga gcc cag aca ctg gac - 3'

を使って、ジデオキシ配列決定反応を実施した。

ファージクローンλ29.5とλSγ1.13は両方ともγ1サブクラスであると決定された。

2. pγel

γ1コード領域を含むファージクローンλ29.5の7.8kb Hind III断片をpUC18中にクローニングした。生じたプラスミドpLTIをXho Iで消化し、クレノウ断片で処理し、そして再連結せしめて内部Xho I部位を破壊した。生じたクローンpLTIxkをHind IIIで消化し、挿入断片を単離し、pSP72中にクローニングしてプラスミドクローンpLTIxksを作製した。ポリリンカー-Xho I部位とヒト配列由来のBamH I部位のところでのpLTIxksの消化は、γ1定常領域コードエクソンを含む7.6kb断片を与えた。この7.6kb Xho I/BamH I断片を、ファージクローンλ29.5からの隣接の下流4.5kb BamH I断片と一緒に、Xho I/BamH Iで消化されたpGPe中にクローニングし、プラスミドpγelを作製した。pγelは、ラット重鎖3' エンハンサーに連結された、5kbの下流配列と共にγ1定常領域コードエクソンの全部を含有する。

3. pγe2

γ1スイッチ領域とスイッチ前不毛転写物 (sterile transcript) [P. Sideraら (1989), *International Immunol.*, 1, 631] の第一エクソンとを含む5.3kbのHind I II断片をファージクローンλSγ1.13から単離し、そして挿入断片の5' 末端の近隣にポリリンカー-Xho I部位を有するpSP71中にクローニングし、プラスミドクローンpSγ1sを作製した。pSγ1sのXho I/Sal I挿入断片をXho Iで消化されたpγel中にクローニングし、プラスミドクローンpγe2を作製した (図31)。pγe2は、ラッ※

オリゴ-49 5' - gtt aaa gag gat ttt att cac ccc tgt gtc

ctc tcc aca ggt gtc - 3'

を用いてスクリーニングした。

ファージクローンλ49.8を単離し、そして可変セグメントVH49.8を含む6.1kb Xba I断片をpNN03中にサブクローニングし (ポリリンカー-Cla I部位がVH49.8の下流にそしてポリリンカー-Xho I部位が上流にくるように)、

76

*ニングλSγ1.13を単離した。異なるγクローンのサブクラスを決定するために、鋳型として上記3つのファージクローンの各々のサブクローンを使ってそしてプライマーとして次のオリゴヌクレオチド:

※ト重鎖3' エンハンサーに連結された、下流の5kb配列と共に、γ1定常領域コードエクソン全部並びに上流のスイッチ領域および不毛転写物エクソンを含有する。このクローンは、挿入断片の5' 末端にユニークXho I部位を含む。全挿入断片は、Xho I部位及び3' ラットエンハンサーと共に、Not Iでの消化によりベクター配列から切除される。

4. pHCl

プラスミドpIGM1をXho Iで消化し、43kb挿入断片を単離し、そしてXho Iで消化されたpγe2中にクローニングし、プラスミドpHClを作製した (図30)。pHClは、下記の配列要素の全部がNot Iでの消化によりベクター配列を含まない単一断片において単離しそしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を作製することができるよう、ラット重鎖3' エンハンサーと共に、2つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのヒトDセグメント、6つのヒトJ_Hセグメント全部、ヒトJ-μエンハンサー、ヒトσμ要素、ヒトμスイッチ領域、ヒトμコードエクソン全部、ヒトΣμ要素、およびヒトγ1定常領域 (関連のスイッチ領域および不毛転写物関連エクソンを含む) を含有する。

D. IgMとIgGを発現する小遺伝子鎖トランスジェンpHC2の作製

1. ヒト重鎖V領域遺伝子VH49.8の単離

ヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーラムダFIX™ II (Stratagene, La Jolla, CA) を、次のヒトVH1ファミリー特異的オリゴヌクレオチド:

プラスミドpVH49.8を作製した。この挿入断片の800bp領域を配列決定すると、VH49.8は転写解読枠並びに完全なスプライシングシグナルおよび組換えシグナルを有することがわかり、よって該遺伝子が機能的であることを指摘する (表2)。

77	TTCTCTAGGC AGGATTTAGG GCTTGGTCTC TCAGCATCCC ACACTTGTAC	78	50
	AGCTGATGTG GCATCTGTGT TTCTTTCTC ATCTAGATC AAGCTTTGAG		100
	CTGTGAATA CCTGCCTCA TGAATATGCA AATAATCTGA GGTCTTCTGA		150
	GATAAATATA GATATATTGG TGCCCTGAGA GCATCACATA ACAACCATAT		200
	TOCTOCTCTA AAGAAGCCCC TGGGAGCACA GCTCATCACC ATGGACTGGA		250
	CCTGGAGGTT CCTCTTTGIG GTGGCAGCAG CTACAGgtaa ggggcttcct	MetAspTrpT	300
	hrTrpArgPh eLeuPheVal ValAlaAlaA laThr		
	agtcctaagg ctgaggaagg gatcctggct tagttaaaga ggattttatt		350
	cacccctgtg tctctctccac agGTGTCCAG TCCCAGGTCC AGCTGGTGCA		400
	GTCTGGGGCT GGGTGAAGA AGCCTGGGTC CTGGTGAAG GTCTCTGCA	GlyValGln SerGlnValG InLeuValG	450
	nSerGlyAla GluValLysL ysProGlySe rSerValLys ValSerCysL		
	AGGCTTCTGG AGGCCTTTC AGCAGCTATG CTATCAGCTG GGTGGGACAG		500
	ysAlaSerGl yGlyThrPhe SerSerTyrA laIleSerTr pValArgGln		
	GOOCTGGAC AAGGGCTTGA GTGGATGGGA AGGATCATCC CTATCTTGG		550
	AlaProGlyG InGlyLeuGl uTrpMetGly ArgIleIleP roIleLeuGl		
	TATAGCAAAC TACGCACAGA AGTTCAGGG CAGAGTCACG ATTACCGCGG		600
	yIleAlaAsn TyrAlaGlnL ysPheGlnGl yArgValThr IleThrAlaA		
	ACAAATCCAC GAGCACAGCC TACATGGAGC TGAGCAGCCT GAGATCTGAG		650
	spLysSerTh rSerThrAla TyrMetGluL euSerSerLe uArgSerGlu		
	GACACGGCCG TGTATTACTG TGCGAGAGC ACAGTGTGAA AACCCACATC		700
	AspThrAlaV alTvrTyrCy sAlaArg		
	CTGAGAGTGT CAGAAACCT GAGGAGAGG GCAGCTGTGC CCGGCTGAGG		750
	AGATGACAGG GTTTATTAGG TTAAAGGCTG TTTACAAAAT GGGTTATATA		800
	TTTGAGAAAA AA		812

表2 ヒトV_H Iファミリー遺伝子V_H49.8の配列

2. pV2

プラスミドpUC12中にサブクローニングされたヒトV_H IVファミリー遺伝子V_H 4-21 (I. Sanzら (1989) EMBO J. 8, 3741) を含む4kb Xba Iゲノム断片をSma IとHind IIIで切り出し、ポリメラーゼIのクレノウ断片で処理

した。平滑末端化された断片を、Cla Iで消化されクレノウで処理されたpVH49.8中にクローニングした。生じたプラスミドpV2は、挿入断片の3'末端のユニークSal I部位および5'末端のユニークXho IVを使って、同じ方向で部位H4-21の上流に連結された、ヒト重鎖遺伝子

VH49.8を含む。

3. pSy 1-5'

近隣の upstream 3.1kb Xba I断片と一緒に0.7kb Xba I/Hind III断片 (プラスミド p γ e2中の5.3kb γ 1 スイッチ領域含有断片のすぐ上流で且つそれに隣接した配列を表す) ファージクローン λ Sgl. 13から単離し、そしてHind III/Xba Iで消化されたpUC18ベクター中にクローニングした。生じたプラスミドpSy 1-5' は、 γ 1 イソタイプにスイッチする前のB細胞中に見つかる不毛転写物 (sterile transcript) [P. Siderasら (1989) *International Immunol.* 1, 631] の開始部位の上流の配列を表す3.8kb挿入断片を含む。該転写物はイソタイプスイッチの開始に関係があり、そして上流のシス作用性配列はしばしば転写調節に重要であるので、不毛転写物の正しい発現および関連するスイッチ組換えを促進するために、それらの配列がトランスジェン構成物中に含まれる。

4. pVGE1

pSy 1-5' 挿入断片をSma IとHind IIIで切り出し、クレノウ酵素で処理し、そして次のオリゴヌクレオチドリンカー:

5' - ccg gtc gac cgg - 3'

と連結せしめた。この連結生成物をSal Iで消化し、Sal Iで消化されたpV2に連結せしめた。生じたプラスミドpVPは、2つの機能的ヒト可変遺伝子セグメントVH49.8とVH4-21 (表2参照) の下流に連結された3.8kbの γ 1 スイッチ5' 隣接配列を含む。Sal Iでの部分消化およびXho Iでの完全消化の後、アガロースゲル上での15kb断片の精製により、pVP挿入断片を単離する。次いで該挿入断片をp γ e2のXho I部位中にクローニングし、プラスミドクローンpVGE1 (図32) を作製する。pVGE1は、ヒト γ 1 定常遺伝子および関連のスイッチ領域の上流に2つのヒト重鎖可変遺伝子セグメントを含有する。可変領域と定常領域との間のユニークSal I部位を用いて、D、Jおよび μ 遺伝子セグメントをクローニングすることができる。 γ 1 遺伝子の3' 末端にラット重鎖3' エンハンサーが連結され、そして挿入断片全体はNot I部位により隣接される。

5. pHC2

プラスミドクローンpVGE1をSal Iで消化し、pIGM1のXho I挿入断片をその中にクローニングした。生じたクローンpHC2 (図30) は、4つの機能的ヒト可変領域セグメント、少なくとも8つのDセグメント、6つのヒトJ μ セグメント全部、ヒトJ- μ エンハンサー、ヒト σ μ 要素、ヒト μ スイッチ領域、ヒト μ コードエクソン全部、ヒト Σ μ 要素、およびヒト γ 1 定常領域 (不毛転写物開始部位の上流の4kb隣接配列と共に、関連のスイッチ領域と不毛転写物関連エクソンを含む) を含有する。それ

らのヒト配列は、前記配列要素全部をNot Iでの消化によりベクター配列を含まない単一鎖上に単離しそしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を生ぜしめることができるように、ラット重鎖3' エンハンサーに連結される。該挿入断片の5' 末端のユニークXho I部位を使って、追加のヒト可変遺伝子セグメントをその中にクローニングし、この重鎖小遺伝子座の組換え多様性を更に増大させることができる。

10 E. トランスジェニックマウス

プラスミドpIGM1およびpHC1のNot I挿入断片をアガロースゲル電気泳動によりベクター配列から単離した。精製された挿入断片を、受精した (C57BL/6 \times CBA) F2マウスの胚の前核中にマイクロインジェクトし、そして生存している胚を、Hoganらにより記載された通りに (B. Hogan, F. CostantiniおよびE. Lacy, *Methods of Manipulating the Mouse Embryo*, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 偽妊娠した雌に移した。注入された胚から発育したマウスを、尾部DNAのサザンブロット分析によりトランスジェン配列の存在について分析した。既知量のクローン化DNAを含有する対照標準物に比較したバンド強度により、トランスジェンコピー数を評価した。3~8週齢において、それらの動物から血清を単離し、そしてHarlowおよびLane (E. HarlowおよびD. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) により記載されたように、トランスジェンによりコードされるヒトIgMおよびIgG1の存在についてELISAによりアッセイした。マイクロタイタープレートのウェルを、ヒトIgMに特異的なマウスモノクローナル抗体 (クローンAF6, #0285, AMAC, Inc. Westbrook, ME) およびヒトIgGに特異的なマウスモノクローナル抗体 (クローンJL512, #0280, AMAC, Inc. Westbrook, ME) によりコーティングした。該ウェル中に血清試料を連続的に希釈し、予備吸着させることによってマウス免疫グロブリンとの交差反応性を最小限にしたアフィニティー単離されたアルカリホスファターゼ接合ヤギ抗ヒトIg (多価) を用いて、特異的免疫グロブリンの存在を検出した。図33は、プラスミドpHC1のトランスジェン挿入断片を注入した胚から発育した2匹の動物の血清中のヒトIgMおよびIgG1の存在についてのELISAアッセイの結果を示す。1匹の動物 (#18) は、サザンブロット分析によればトランスジェンについて陰性であり、検出可能レベルのヒトIgMまたはIgG1を全く示さなかった。2番目の動物 (#38) は、サザンブロット分析によれば該トランスジェンの約5コピーを含んでおり、そして検出可能レベルのヒトIgMとIgG1の両方を示した。トランスジェンを注入した胚から発育した11匹の動物についてのELISAアッセイの結果を下表 (表3) に要約する。

表3 ELISA アッセイによるトランスジェニック動物の血清中のヒトIgMおよびIgG1の検出

動物 #	注入したトランスジェン	およそのトランスジェンコピー数 (細胞あたり)	ヒトIgM	ヒトIgG1
6	pIGM1	1	++	-
7	pIGM1	0	-	-
9	pIGM1	0	-	-
10	pIGM1	0	-	-
12	pIGM1	0	-	-
15	pIGM1	10	++	-
18	pHC1	0	-	-
19	pHC1	1	-	-
21	pHC1	<1	-	-
26	pHC1	2	++	+
38	pHC1	5	++	+

表3は、組み込まれたトランスジェンDNAの存在と血清中のトランスジェンによりコードされる免疫グロブリンとの間の相関関係を示す。pHC1トランスジェンを含むことがわかった動物のうちの2匹は、検出可能なレベルのヒト免疫グロブリンを発現しなかった。それらは共に低コピー動物であり、該トランスジェンの完全なコピーが含まれていないか、または該動物が遺伝的モザイクを有している（動物#21について評価された細胞あたり<1コピーにより指摘される）ことがあり、そしてトランスジェン含有細胞が造血系統に移っていない場合がある。あるいは、トランスジェンがそれらの発現に至らないゲノム領域中に組み込まれている場合がある。pIGM1トランスジェニック動物の血清中のヒトIgMの検出、並

* びにpHC1トランスジェニック動物の血清中のヒトIgMとIgG1の検出は、トランスジェン配列がVDJ結合、転写およびイソタイプスイッチを指令する上で正しく機能することを指摘する。

実施例15

再配列された重鎖トランスジェン

A. 再配列されたヒト重鎖VDJセグメントの単離

ファージベクターλEMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングされた2種のヒト白血球ゲノムDNAライブラリーを、ヒト重鎖J-μイントロンエンハンサーを含むλ1.3の1kb Pac I/Hind III断片を用いてスクリーニングする。陽性クローンを、次のV_H特異的オリゴヌクレオチド:

オリゴ-7 5' - tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga
tac acc ttc acc- 3'

オリゴ-8 5' - tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga
ttc acc ttc agt- 3'

の混合物とのハイブリダイゼーションについて試験する。

VプローブとJ-μプローブの両方とハイブリダイズ

するクローンを単離し、そして再配列されたVDJセグメントのDNA配列を決定する。

B. 再配列されたヒト重鎖トランスジェンの作製

機能的VJセグメントを含む断片（転写解読枠およびスプライシングナル）を、プラスミド由来のXho I部位が挿入断片配列の5'末端に隣接するように、プラスミドベクターpSP72中にサブクローニングする。機能的VDJセグメントを含むサブクローンをXho IとPac I（Pac IはJ-μイントロンエンハンサー近くの部位を認識する稀少な切断酵素である）で消化し、そして挿入断片をXho I/Pac Iで消化されたpHC2中にクローニングし、機械的VDJセグメント、J-μイントロンエンハンサー、μスイッチ要素、μ定常領域コードエクソンおよびγ1定常領域（これは不毛転写物関連配列、γ1スイッチおよびコ*

オリゴ-81 5' -ggc cgc atc ccg ggt ctc gag gtc gac aag
ctt tcg agg atc cgc- 3'

オリゴ-82 5' -ggc cgc gga tcc tcg aaa gct tgt cga cct
cga gac ccg gga tgc- 3'

をその中に連結せしめる。生じたプラスミドpGP1cは、N ot I部位により隣接されたXma I, Xho I, Sal I, Hind II IおよびBamH I制限部位を有するポリリンカーを含む。

オリゴ-87 5' -ggc cgc tgt cga caa gct tat cga tgg atc
ctc gag tgc- 3'

オリゴ-88 5' -ggc cgc act cga gga tcc atc gat aag ctt
gtc gac agc- 3'

をその中に連結せしめる。生じたプラスミドpGP1dは、N ot I部位により隣接されたSal I, Hind III, Cla I, BamH IおよびXho I制限部位を有するポリリンカーを含む。

B. JκおよびCκクロンの単離

オリゴ-36 5' -cac ctt cgg cca agg gac acg acf gga gat
taa acg taa gca- 3'

を用いてスクリーニングし、そしてファージクローン136.2と136.5を単離する。136.2からJκ1セグメントを含む7.4kb Xho I断片を単離し、プラスミドpNN03中にサブクローニングしてプラスミドクローンp36.2を作製する。Cκ遺伝子セグメントと共にJκセグメント2〜5を含む近隣の13kb Xho I断片をファージクローン136.5から単離し、そしてプラスミドpNN03中にサブクローニングしてプラスミドクローンp36.5を作製する。それら2つのクローンを一緒にすると、Jκ1の7.2kb上流で始まりCκの9kb下流で終わる領域に及ぶ。

C. 再配列された軽鎖トランスジェンの作製

1. 再配列された可変セグメントを発現させるためのCκベクターpCK1

*ードエクソンを含む）を有するトランスジェン構成物を作製する。上述したように、このトランスジェン構成物をNot Iで切り出し、そしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を作製する。

実施例16

軽鎖トランスジェン

A. プラスミドベクターの作製

1. プラスミドベクターpGP1c

プラスミドベクターpGP1aをNot Iで消化し、そして次のオリゴヌクレオチド:

※2. プラスミドベクターpGP1d

プラスミドベクターpGP1aをNot Iで消化し、そして次のオリゴヌクレオチド:

※

★

★ ファージベクターλEMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを、ヒトκ軽鎖J領域特異的オリゴヌクレオチド:

Cκ遺伝子を含むプラスミドクローンp36.5の13kb Xho I断片を、9kbの下流配列と一緒に、該挿入断片の5'末端がプラスミドXho I部位に隣接した状態で、プラスミドベクターpGP1cのSal I部位中にクローニングする。生じたクローンpCK1は、再配列されたVJκセグメントを含むクローニング断片をユニーク5' Xho I部位に收容することができる。次いで該トランスジェンをNot Iで切り出し、ゲル電気泳動によってベクター配列から精製する。得られたトランスジェン構成物は、ヒトJ-Cκイントロンエンハンサーを含むであろうし、ヒト3'κエンハンサーを含むことができる。

2. 再配列された可変セグメントを発現させるための重鎖エンハンサー含有CκベクターpCK2

マウス重鎖J-μイントロンエンハンサー [J. Banerjiら (1983) *Cell*, 33, 729-740] を含むマウスゲノムDNAの0.9kb Xba I断片をpUC18中にサブクローニングし、プラスミドpJH22.1を作製した。このプラスミドをSph Iにより線状化し、クレノウ酵素を用いて末端をフィルインした。クレノウ処理されたDNAを次いでHind IIIで消化し、そしてヒト重鎖J-μイントロンエンハンサー [A. Haydayら (1984) *Nature*, 307, 334-340] を含むファージクローンλ1.3 (前の実施例) のMlu I (クレノウ)/Hind III断片をそれと連結した。生じたプラスミドpMHE1は、両者が単一のBamH I/Hind III断片上に切除されるように、pUC18中に一緒に連結されたマウスとヒトの重鎖J-μイントロンエンハンサーから成る。この2.3kb断片を単離し、pGP1c中にクローニングしてpMHE2を作製する。pMHE2をSal Iで消化し、p36.5の13kb Xho I挿入断片をその中にクローニングする。生じたプラスミド

オリゴ-65 5' -agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac
ttc act ctc acc atc agc - 3'

とのハイブリダイゼーションについて試験した。VプロブとJプロブの両方とハイブリダイズしたクローンを単離し、そして再配列されたVJκセグメントのDNA配列を決定する。

3. 再配列されたヒト軽鎖構成物を含有するトランスジェニックマウスの作製

機能的VJセグメントを含む断片 (転写解読枠およびスプライスシグナル) をベクターpCK1およびpCK2のXho I部位中にサブクローニングし、再配列されたκ軽鎖トランスジェン構成物をベクター配列から単離する。アガロースゲル上で精製した挿入断片をマウス胚の前核中にマイクロインジェクトし、トランスジェニックマウスを作製する。ヒトκ鎖を発現している動物を、重鎖小遺伝子を含有するトランスジェニック動物 (実施例14) と交配し、ヒト抗体を完全に発現するマウスを作る。

VJκ組合せの全部が、広域スペクトルの種々の重鎖VDJ組合せと共に安定な重鎖-軽鎖複合体を形成できるわけではないので、それぞれ異なる再配列されたVJκクローンを使って幾つかの異なる軽鎖トランスジェン構成物を作製し、そして重鎖小遺伝子座トランスジェンを発現するマウスと交配させる。二重トランスジェニック (重鎖構成物と軽鎖構成物の両方) 動物から、末梢血、脾臓およびリンパ筋リンパ球を単離し、ヒトおよびマウスの重鎖および軽鎖免疫グロブリンに特異的な蛍光抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) で染色し、そしてFACSscan分析装置 (Becton Dickinson, San Jose, CA) を使ってフローサイトメトリーにより分析する。最大数のB細胞の表面上に最高レベルのヒト重鎖/軽鎖複合体を生じ且つ免疫細胞区分に悪影響を与えない (BおよびT細胞サブセッ

* DpCK2は、マウスとヒトの重鎖J-μイントロンエンハンサーがトランスジェン挿入断片の3'末端に融合していること以外は、pCK1と同一である。最終トランスジェンの発現を調節するために、異なるエンハンサー、即ちマウスまたはラットの3'κまたは重鎖エンハンサー [K. MeyerおよびM. S. Neuberger (1989) *EMBO J.*, 8, 1959-1964; S. Pettersonら (1990) *Nature*, 344, 165-168] を使って類似構成物を作製することができる。

2. 再配列されたκ軽鎖可変セグメントの単離

10 ファージベクターλEMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングされた2つのヒト白血球ゲノムDNAライブラリーを、p36.5の3.5kb Xho I/Sma I断片を含むヒトκ軽鎖J領域を用いてスクリーニングした。陽性クローンを、次のVκ特異的オリゴヌクレオチド:

ト特異的抗体を用いたフローサイトメトリー分析によりアッセイした時) 再配列された軽鎖トランスジェン構成物を、ヒトモノクローナル抗体の産生のために選択する。

D. 再配列されていない軽鎖小遺伝子座トランスジェンの作製

1. 小遺伝子座トランスジェンを作製するためのJκ, Cκ含有ベクターpJCK1

30 p36.5の13kbのCκ含有Xho I挿入断片をクレノウ酵素で処理し、Hind IIIで消化されクレノウ処理されたプラスミドpGP1d中にクローニングする。挿入断片の5'末端がベクター由来のCla I部位に隣接するようなプラスミドクローンを選択する。生じたプラスミドp36.5-1dをCla Iで消化し、クレノウで処理する。p36.2のJκ1含有7.4kb Xho I挿入断片をクレノウで処理し、そしてCla Iで消化されクレノウ処理されたp36.5-1d中にクローニングする。p36.2挿入断片がp36.5挿入断片と同じ方向にあるクローンを選択する。このクローンpJCK1 (図34) は、7.2kbの上流配列および9kbの下流配列と一緒に、完全なヒトJκ領域およびCκ領域を含む。該挿入断片はヒトJ-Cκイントロンエンハンサーも含み、ヒト3'κエンハンサーを含むこともある。該挿入断片は、追加の3'隣接配列、例えば重鎖または軽鎖エンハンサーをクローニングする目的でユニーク3' Sal I部位により隣接される。ユニークXho I部位は、再配列されていないVκ遺伝子セグメント中でクローニングする目的で該挿入断片の5'末端に置かれる。ユニークSal IおよびXho I部位は、最終のトランスジェン構成物をベクター配列から単離するために使われるNot I部位により隣接される。

2. 再配列されていないV κ 遺伝子セグメントの単離およびヒトIg軽鎖タンパク質を発現するトランスジェニック動物の作製

V κ 特異的オリゴヌクレオチドであるオリゴ-65 (上述) を使って、ファージベクターEMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) 中にクローニングされたヒト胎盤ゲノムDNAライブラリーを探索する。生じたクローンからの可変遺伝子セグメントを配列決定し、そして機能的と思われるクローンを選択する。機能性を判断するための基準は、転写解読枠、完全なスプライス受容体および供与体配列、並びに完全な組換え配列を含むことである。選択された可変遺伝子セグメントを含むDNA断片を、プラスミドpJCK1のユニークXho I 部位にクローニングし、小遺伝子座構成物を作製する。*

オリゴ- "a" 5' - ggc cgc atg cta ctc gag tgc aag ctt ggc
cat cca - 3'

オリゴ- "b" 5' - ggc ctg gat ggc caa gct tgc act cga gta
gca tgc - 3'

生じたプラスミドpGP1fは、Not I部位とSfi I部位により隣接されたSph I, Xho IおよびHind III部位を含む。

2. pVHf

ヒトV μ -Vファミリー可変遺伝子セグメントV μ 251

[C. G. Humphriesら (1988) *Nature*, 331, 446] を約2.4 kbの5' 隣接配列と約1.4 kbの3' 隣接配列と一緒に、4.2 kbのSph I/Hind III断片上においてプラスミドpVH251 ※

オリゴ- 83 5' - cag ctc gag ctc ggc aca ggc gcc tgt ggg - 3'

オリゴ- 84 5' - ctc tag agt cga cct gca ggc - 3'

3' 隣接配列を、次のオリゴヌクレオチドを使ったPC★ ★Rにより増幅させる:

オリゴ- 85 5' - agc ctc gag ccc gtc taa aac cct cca cac - 3'

オリゴ- 86 5' - ggt gac act ata gaa tac tca agc - 3'

増幅された5' 配列をSph IとXho Iで消化し、そして増幅された3' 配列をHind IIIとXho Iで消化する。得られた断片と一緒にプラスミドpGP1f中にクローニングし、プラスミドpVHfを作製する。プラスミドpVHfは、シグナル配列をコードする第一エクソンと共に、V μ 251の転写を調節するシス作用性調節要素を含有する。pVHfは重鎖可変配列のための発現カセットとして使われる。そのような配列は後述のようなKas I/Xho Iで消化されたプラスミド中にクローニングされる。

B. 可変遺伝子コード配列の単離

1. 発現されるV μ 遺伝子cDNA配列の増幅

オリゴ- 69 5' - gga att ctc aca gga gac gag - 3'

をそれぞれ5' および3' プライマーとして使用する。オリゴ-69はIgM定常領域のアミノ酸11~17をコードす

*得られたクローンをNot Iで消化し、挿入断片を単離し、そしてマウス胚の前核中にマイクロインジェクトしてトランスジェニック動物を作製する。それらの動物のトランスジェンは、B細胞の発達の際にV-J結合を受けるであろう。ヒト κ 鎖を発現する動物を、重鎖小遺伝子座を含有するトランスジェニック動物と交配し、ヒト抗体を完全に発現するマウスを得る。

実施例17

合成重鎖可変領域

この実施例は図35に要約される。

A. クローニングベクターpVHfの作製

1. pGP1f

プラスミドpGP1a (前の実施例) をNot Iで消化し、そして次のオリゴヌクレオチドをそれと連結せしめる:

※ (前の実施例) から単離し、そしてプラスミドベクターpSelect™-1 (Promega Corp., Madison, WI) 中にクローニングした。5' 隣接配列を、V μ 251のプロモーター、第一エクソンおよび第一イントロンと一緒に、次のオリゴヌクレオチドを使ったポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりこの鋳型から増幅させる:

☆ ヒト末梢血リンパ球 (PBL) からポリ (A) ⁺RNAを単離する。逆転写酵素を用いて、プライマーとしてオリゴ- (dT) を使って、第一鎖cDNAを合成する。第一鎖cDNAを単離し、そしてターミナルトランスフェラーゼを使ってオリゴ (dG) 末端を付加する。次いで、Frohmanら (1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998) の方法の変形により、IgM転写物の5' 配列を特異的に増幅させる。dG末端を付加した第一鎖PBL cDNAを用いたポリメラーゼ連鎖反応において、オリゴ- (dC) ₁₃および次のオリゴヌクレオチド:

る配列に相補的である。従って、それらのプライマーは、発現されるV μ 遺伝子配列を含む約0.6 kbのDNA断片を

増幅させるだろう。

2. 生殖型遺伝子形態へのcDNA配列の逆変換

* 次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"c" 5' - ctg acg act ctg tat ggc gcc (ct)a(cg)
t(cg)(ct) (cg)ag (ag)t(cg) ca(ag) ct(gt) gtg
(cg)a(ag) tc(gt) gg(gt) - 3'

を、変性されPCR増幅されたIgM5' 配列にアニールせしめる。オリゴ-"c"は、Kas I部位を含む21ヌクレオチド非縮重配列に次いで、多数のヒトV_Hセグメントの第二エクソンの5' 末端に相同である30ヌクレオチド縮重配列

※列を含有する (Genbank; Los Alamos, NM)。このプライマーをDNAポリメラーゼで伸長し、生成物をサイズ分画により未使用のプライマーから単離する。次いで該生成物を変性せしめ、次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"d" 5' - ggg ctc gag gct ggt ttc tct cac tgt gtg
t(cgt)t (acgt)(ag)(ct) aca gta ata ca(ct)
(ag)g(ct) - 3'

にアニールせしめる。

オリゴ-"d"は、Xho I部とV-DJ組換え配列の一部を含む30ヌクレオチド非縮重配列に次いで、多数のヒト可変遺伝子セグメントのフレームワーク領域3中の最後の7アミノ酸をコードする配列に相補的である21ヌクレオチド縮重配列を含有する。アニールしたオリゴヌクレ

★オチドをDNAポリメラーゼで伸長し、そして生成物をサイズ分画により未使用のプライマーから単離する。個々の可変遺伝子断片の配列保全性を確実にするために、DNA合成の1巡終了ごとにプライマーの除去を行う。オリゴ-"d"プライマー伸長生成物を、プライマーとして次の2つのオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"e" 5' - ctg acg act ctg tat ggc gcc - 3'
オリゴ-"f" 5' - ggg ctc gag gct ggt ttc tct - 3'

を使ってPCRにより増幅せしめる。得られた0.36kbのPCR生成物をゲル電気泳動により精製し、制限酵素Kas IとXho Iにより消化する。次いで消化生成物をKas I/Xho Iで消化されたpVHF中にクローニングし、生殖細胞型配置において発現される可変遺伝子配列のライブラリーを作製する。pVHFのKas I部位中への連結は、第二エクソンの5' 末端のところにスプライス受容体部位を再構築し、Xho I部位中への連結は可変遺伝子セグメントの3' 末端のところに組換えシグナルを再構築する。縮重オリゴヌクレオチド "c"および "d"の別の変形を使って異なる集団の可変遺伝子を増幅せしめ、それらの異なる集団を表す生殖細胞型配置のライブラリーを作製する (Genbank; Los Alamos, NM)。

☆c. 合成遺伝子座の作製

合成生殖細胞配置V_H遺伝子のライブラリー全体を一緒に増殖させ、プラスミドを単離する。中程度コピープラスミドpVHF (これはアンピシリン耐性遺伝子とクローニング部位との間に強力な転写ターミネーターを含む)は、ライブラリー内の特定のクローンの増大を最小にするためにデザインされる。プラスミドDNAをSfi Iで消化し、子ウシ腸ホスファターゼで処置して5' リン酸基を除去し、次いでNot Iで消化する。Sfi I末端のみが脱リン酸されるように、Not I消化前に子ウシ腸ホスファターゼを除去する。消化したDNAをアガロースゲル電気泳動によってベクター配列から単離し、そして次のオリゴヌクレオチド:

オリゴ-"g" 5' - ggc cta act gag cgt ccc ata ttg aga acc
tcc - 3'

オリゴ-"h" 5' - ggt tct caa tat ggg acg ctc agt ta - 3'

に連結せしめる。オリゴ-"g"をリン酸化しないままでオリゴ-"h"をリン酸化する。V遺伝子断片のNot I末端の全部がオリゴヌクレオチドに連結し別のV領域断片には連結しないように、大モル過剰のオリゴヌクレオチドを使って連結反応を実施する。Sfi I末端は自身とは適合しないので、Vセグメントは各Vセグメントが単一のオリゴヌクレオチドスパーサー単位により次のVセグ

メントから隔てられるようにして同じ方向で鎖状に連結するだろう。

大きな連鎖物を電気泳動によりサイズ分画し、アガロースゲルから単離する。次いで、サイズ分画された連鎖物をD-J-C含有DNA断片 (例えばpHC1またはpHC2挿入断片)と一緒にマウス胚の前核中に同時注入し、多数の一次レパートリーを有するトランスジェニック動物を

作製する。あるいは、該連鎖物をpGPFのようなプラスミドベクター中にクローニングする。

実施例18

リンパ系細胞レセプターサブセット特異的抗体の作製

異種（即ちヒト）免疫グロブリンレセプター（B細胞レセプター）またはT細胞レセプターによるマウスの接種は、優性的に、与えられた種の全てのもしくは大部分の免疫グロブリンまたはT細胞レセプターが共有する

（しかし種間では異なる）特定のエピトープ（優性エピトープ）に対して向けられたマウス抗体の産生をもたらす。従って、B細胞またはT細胞レセプターの特定のサブセット（例えばインタイプまたは可変領域ファミリー）を識別する抗体を単離することは困難である。しかしながら、ヒト免疫グロブリンを発現するマウス（上記実施例に記載）は、それらの共有のB細胞エピトープを免疫学的に寛容するであろうし、従ってヒト免疫グロブリンのサブセットを識別する抗体を産生せしめるのに有用であろう。この概念は、ヒトT細胞レセプターコード配列を発現するトランスジェニックマウスを作製し、そしてそれらのマウスをヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスと交配させることにより拡張される。そのようなマウスにヒトT細胞レセプタータンパク質を含む単離物を接種し、そしてT細胞レセプターサブセットを認識するモノクローナル抗体を産生せしめる。

研究は、ある種の自己免疫疾患に関与するT細胞抗原レセプターには限定された変異性があることを証明している（T. F. Daviesら（1991）*New England J. Med.*, 325, 238）。この限定された変異性のため、自己反応性であるヒトT細胞のサブセットを特異的に認識するヒトモノクローナル抗体を産生することが可能である。

A. B細胞サブセット特異的抗体の産生

ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニックマウスに、健康な提供者からまたは高レベルの単一免疫グロブリン型を発現するB細胞悪性を有する患者から単離した免疫グロブリンを接種する（Millerら（1982）*New England J. Med.*, 306, 517-522）。HarlowおよびLaneにより記載されたように（E. HarlowおよびD. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York）、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製する。B細胞サブセットを特異的に認識するヒト抗体を分泌する個々のハイブリドーマを選択する。

B. ヒトT細胞レセプター配列を発現するトランスジェニックマウス

そのままの且つ完全に再配列されたヒトT細胞レセプター（TCR） α および β 遺伝子を含むDNA断片をマウス胚の前核中に同時注入し、トランスジェニック動物を作製する。トランスジェニック動物をFACS分析によりそれらのT細胞の表面上への両トランスジェンの発現についてアッセイする。少量のT細胞において低レベルのみでヒ

ト α および β TCR鎖を発現する動物を選択する。免疫学的寛容を獲得するためにはごく低レベルのみの発現が要求され、高レベル発現は動物の免疫系を破壊し、モノクローナル抗体の産生に必要な免疫応答を開始する能力を妨害するであろう。あるいは、免疫学的寛容を獲得するためには正しい組織または細胞型特異的発現は要求されないで、TCR α および β 鎖cDNAクローンを非TCR転写シグナルの支配下にトランスジェン発現カセット（T. Ch oiら（1991）*Mol. Cell Biol.*, 11, 3070-3074）中に挿入する。TCR α および β 鎖cDNAトランスジェン構成物をマウス胚の前核中に同時注入してトランスジェニック動物を作製する。TCRは多鎖複合体であるため（H. Cleversら（1988）*Ann. Rev. Immunol.*, 6, 629-662）、TCR鎖の異所性発現は細胞表面発現をもたらさないだろう。しかしながら、細胞表面発現は抗原提示（Townsendら（1986）*Nature*, 324, 575-577）および寛容誘導には必要でない。

T細胞レセプター α および β 鎖トランスジェニックマウスをヒト免疫グロブリン発現性トランスジェニックマウスと交配し、ヒトT細胞の特異的サブセットを認識するヒトモノクローナル抗体を作製するのに有用であるマウスを作製する。そのようなマウスに、健康な患者からまたは単一のTCR型を発現するT細胞悪性を有する患者から単離したT細胞由来タンパク質を接種する。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製し、そしてB細胞サブセットを特異的に認識するヒト抗体を分泌する個々のハイブリドーマを選択する。

実施例19

ゲノム重鎖ヒトIgトランスジェン

この実施例は、接合子中へのマイクロインジェクションまたはES細胞中への組込みによりマウス生殖細胞中に導入される、ヒトゲノム重鎖免疫グロブリントランスジェンのクローニングを記載する。

Marzluff, W. F. ら（1985）, *Transcription and Translation: A Practical Approach*, B. D. HammesおよびS. J. Higgins編, 89-129頁, IRL Press, Oxfordにより記載されたようにして、新鮮なヒト胎盤組織から核を単離する。単離された核（またはPBSで洗浄したヒト精母細胞）を0.5%低融点アガロースブロック中に埋め込み、そして核については500mM EDTA, 1% SDS中の1mg/mlのプロテイナーゼKにより、精母細胞については500mM EDTA, 1% SDS, 10mM DTT中の1mg/mlのプロテイナーゼKにより、50℃にて18時間溶解せしめる。該ブロックを40 μ g/mlのPM SF/TE中で50℃にて30分間インキュベートすることにより、プロテイナーゼKを不活性化する。次いでM. Finneyにより*Current Protocols in Molecular Biology*（F. Ausubelら編, John Wiley & Sons, 増補4, 1988, 例えば第2.5.1章）中に記載されたように、アガロース中で該DNAを制限酵素Not Iで消化する。

Not Iで消化したDNAを、次いでAnand, R. ら（1989）,

Nuc. Acids Res., 17, 3425-3433により記載されたようにパルスフィールドゲル電気泳動により分画する。Not I断片に富む画分をサザンハイブリダイゼーションによりアッセイし、この断片によってコードされる1または複数の配列を検出する。そのような配列は、重鎖Dセグメント、Jセグメントおよび γ 1定常領域と共に6つの V_H ファミリー全部の代表物を含む[この断片はBermanら(1988), 前掲によればHeLa細胞から670kb断片として同定されているけれども、本発明者らはそれがヒト胎盤および精子DNAからのは830kb断片であることを発見した]。このNot I断片を含む画分(図4参照)を記載の如く[McCormick, M.ら(1990), Technique 2, 65-71]ベクターpYACNNのNot I部位中に連結せしめる。プラスミドpYACNNは、pYACneo (Clontech) をEcoR Iで消化しそしてオリゴヌクレオチド5' -AAT TGC GGC CGC-3'の存在下で連結せしめることにより、調製される。

Traverら(1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5898-5902により記載された通りに、重鎖Not I断片を含むYACベクターを単離する。クローン化されたNot I挿入断片を、M. Finney, 前掲により記載されたようなパルスフィールドゲル電気泳動により高分子量酵母DNAから単離する。1mMスベルミンの添加によりDNAを濃縮し、上述した通り単細胞胚の核に直接マイクロインジェクトする。あるいは、DNAをパルスフィールドゲル電気泳動により単離し、そしてリポフェクション[Gnirkeら(1991), EMBO J., 10, 1629-1634]によりES細胞中に導入するか、またはYACをスフェロプラスト融合によりES細胞中に導入する。

実施例20

不連続ゲノム重鎖Igトランスジェン

V_H6 、Dセグメント、Jセグメント、 μ 定常領域および一部の γ 定常領域を含むヒトゲノムDNAの85kb Spe I断片(図4参照)は、本質的には実施例1に記載した通りのYACクローニングによって単離された。生殖細胞型可変領域由来の断片、例えば多コピーの $V_1 \sim V_6$ を含む上記の670-830kb Not I断片の上流の570kb Not I断片、を含有するYACを上述の如く単離する。[Bermanら(1988), 前掲は、各々が多数のVセグメントを含有する2つの570kb Not I断片を検出した。]この2断片を実施例1に記載の如くマウス単細胞胚の核中に同時注入する。

典型的には、2つの異なるDNA断片の同時注入は、染色体内の同一部位のところへ両断片の組込みをもたらす。従って、該2断片各々の少なくとも1コピーを含む生じたトランスジェニック動物の約50%が、定常領域含有断片の上流に挿入されたVセグメント断片を有する。それらの動物のうち、85kb Spe I断片の位置に関する570kb Not I断片の方向性に依存して、約50%がDNA逆位によりV-DJ結合を行い、そして約50%が欠失によりV-DJ結合を行うだろう。生じたトランスジェニック動物が

らDNAを単離し、そしてサザンプロットハイブリダイゼーションにより両方のトランスジェンを含んでいることが示された動物(詳しくは、多数のヒトVセグメントとヒト定常領域遺伝子の両方を含有する動物)を、標準技術に従って、ヒト免疫グロブリンを発現する能力について試験する。

実施例21

重複するYAC断片の連結

重複領域を有する2つのYACを、Silvermanら(1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9913-9917により記載されたような減数分裂組換えにより酵母中で連結せしめ、小型の両YAC由来の配列を担持している単一の大型YACを誘導する。連結したYACが1つの動原体ベクターアームと1つの非動原体ベクターアームを含むように、2つのYACをアームに関して整列せしめる。必要であれば、挿入断片の両末端のユニーク制限部位を使って挿入断片を該ベクター中で再クローニングする。挿入断片がユニーク制限断片でないならば、GuthrieおよびFink(前掲)により記載されたように、酵母のオリゴヌクレオチド形質転換によりベクターアーム中にユニーク部位を挿入する。重複しない不連続配列を有するYACを連結するためには、次のようにして重複を造成する。5' YACの3'末端領域と3' YACの3'末端領域をサブクローニングし、試験管内で連結せしめて結合断片を作り、そして相同組換え(GuthrieおよびFink, 前掲)により一方または両方のYAC中に再導入する。次いで2つのYACを、Silvermanら(前掲)により記載されたようにして減数分裂的に組換える。連結したYACを、例えば実施例1の如く、マウス中に導入する。

30 実施例22

ゲノム κ 軽鎖ヒトIgトランスジェン

ヒト κ 軽鎖の地図はLorenz, W.ら(1987), Nucl. Acid s Res., 15, 9667-9677において記載されており、それを図11に示す。C κ 全部、3'エンハンサー、Jセグメント全部、および少なくとも5つの異なるVセグメントを含む450kb Xho I-Not I断片(a)、または上記の全部と少なくとも20多いVセグメントを含む750kb Mlu I-Not I断片(b)を単離し、そして実施例1に記載の如く接合子またはES細胞中に導入する。

40 実施例23

生体内相同組換えにより形成されたゲノム κ 軽鎖ヒトIgトランスジェン

750kb Mlu I-Not I断片をBssH IIで消化し、約400kbの断片(c)を得る。450kb Xho I-Not I断片(a)と約400kb Mlu I-BssH II断片(c)とは、図11に示されるBssH II制限部位とXho I制限部位とにより範囲限定される配列重複を有する。それらの2断片の相同組換えは、450kb Xho I/Not I断片(実施例22)の中に見つかるものよりも少なくとも15-20多い追加のVセグメントを含むトランスジェンを生成する。

実施例24

トランスジェニック B 細胞中の機能的に再配列された可変領域配列の同定

着目の抗原を使って、次の遺伝的特性: J_H の欠失 (実施例 9 および 12) については内因性所有鎖遺伝子座における同型接合性; 再配列されていないヒト重鎖小遺伝子座トランスジェン (実施例 5 および 14) の単一コピーについては半接合性; および再配列されたヒト κ 軽鎖トランスジェン (実施例 7 および 16) の単一コピーについては半接合性、を有するマウスを免疫処置する [Harlow および Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (1988) を参照のこと]。

免疫処置スケジュールの後、脾臓を取り出し、脾細胞を使ってハイブリドーマを調製する。着目の抗原と反応性である抗体を分泌する個々のハイブリドーマクローンからの細胞を使ってゲノム DNA を調製する。ゲノム DNA の試料を、ユニークな 6 塩基対配列を認識する幾つかの異なる制限酵素で消化し、そしてアガロースゲル上で分画する。サザンブロットハイブリダイゼーションを使って 2~10kb 範囲内の 2 つの DNA 断片を同定する。該断片の一方は、再配列されたヒト重鎖 VDJ 配列の単一コピーを含み、もう一方は再配列されたヒト軽鎖 VJ 配列の単一コピーを含む。それらの 2 断片をアガロースゲル上でサイズ分画し、pUC18 中に直接クローニングする。クローン化された挿入断片を、定常領域配列を踏む重鎖および軽鎖発現カセット中にそれぞれサブクローニングする。

プラスミドクローン p γ el (実施例 14) を重鎖発現カ

セットとして使用し、再配列された VDJ 配列を Xho I 部位中にクローニングする。プラスミドクローン pCK1 を軽鎖発現カセットとして使用し、再配列された VJ 配列を Xho I 部位中にクローニングする。生じたクローンを一緒に使って SP₀ 細胞をトランスフェクトせしめ、着目の抗原と反応する抗体を産生せしめる [M. S. Co ら (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:2969]。

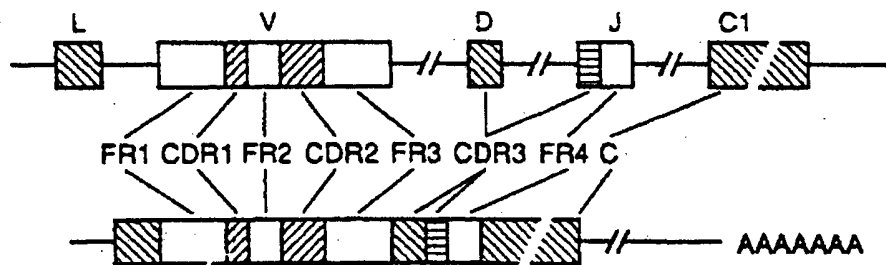
あるいは、上述のクローン化ハイブリドーマ細胞から mRNA を単離し、cDNA を合成するのに使う。発現されるヒト重鎖および軽鎖 VDJ および VJ 配列を、次いで PCR により増幅し、クローニングする [J. W. Larrich ら (1989) *Bio. L. Technology*, 7:934-938]。それらのクローンのヌクレオチド配列を決定した後、同じポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを合成し、そして C. Queen ら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5454-5458] により載されたようにして合成発現ベクターを作製する。

本発明の好ましい態様の今までの記載は、例示および説明のために与えられる。それらが徹底的であるつもりはなく、また本発明を正確な開示形態に制限するつもりはない。上記教示に照らして多数の改良および変更が可能である。

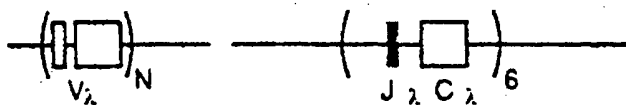
本明細書中の全ての刊行物および特許出願は、あたかも各々の刊行物または特許出願が明確に且つ個別に参考として本明細書中に組み込まれると指摘されたかのように、参考として本明細書中に組み込まれる。

当業者により明らかであろうそのような改良および変更は本発明の範囲内であるものとする。

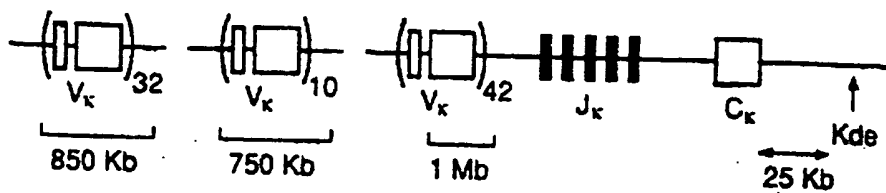
【第 1 図】



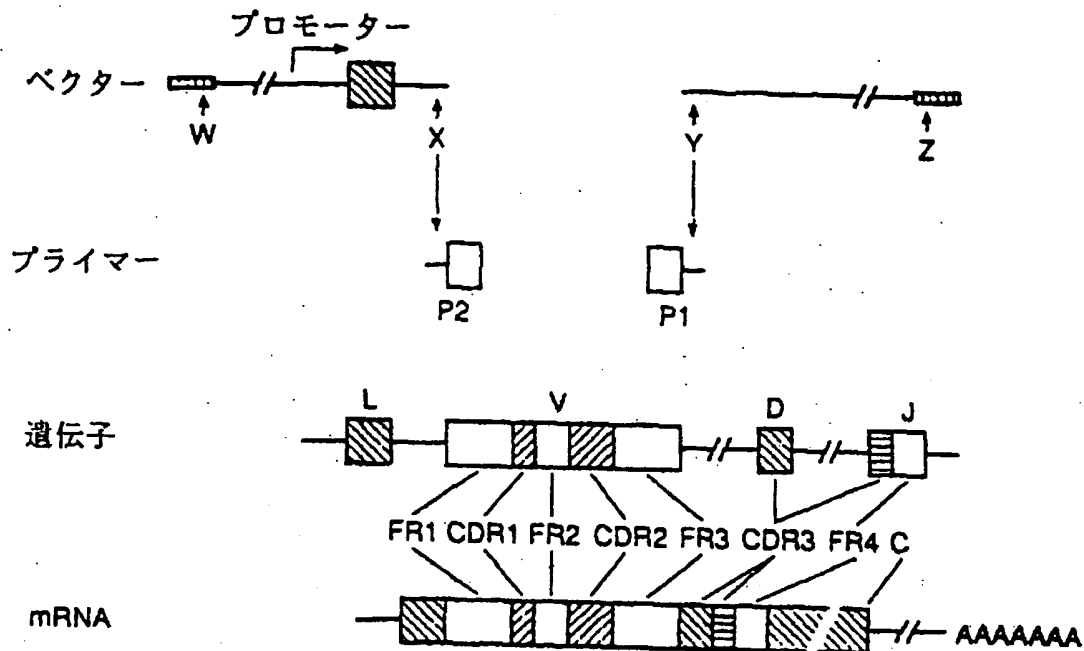
【第 2 図】



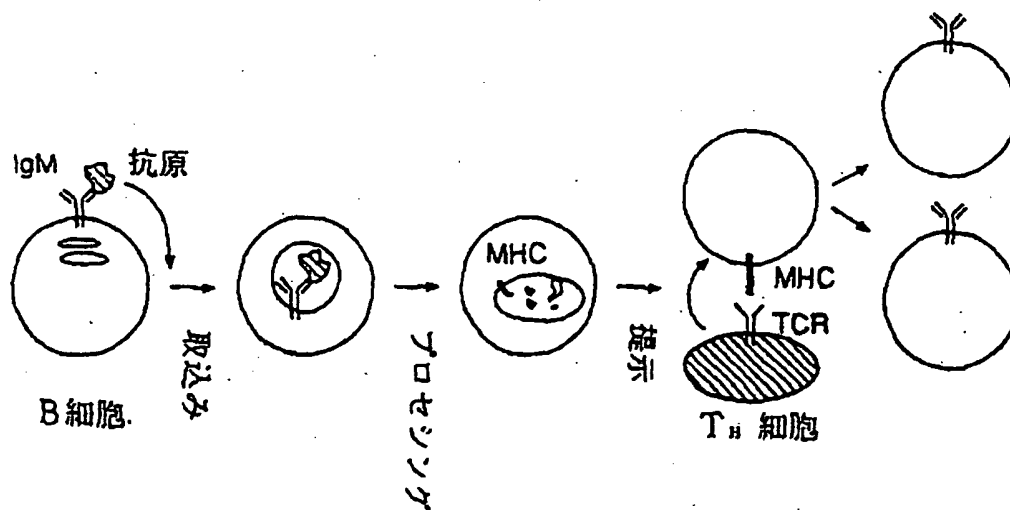
【第3図】



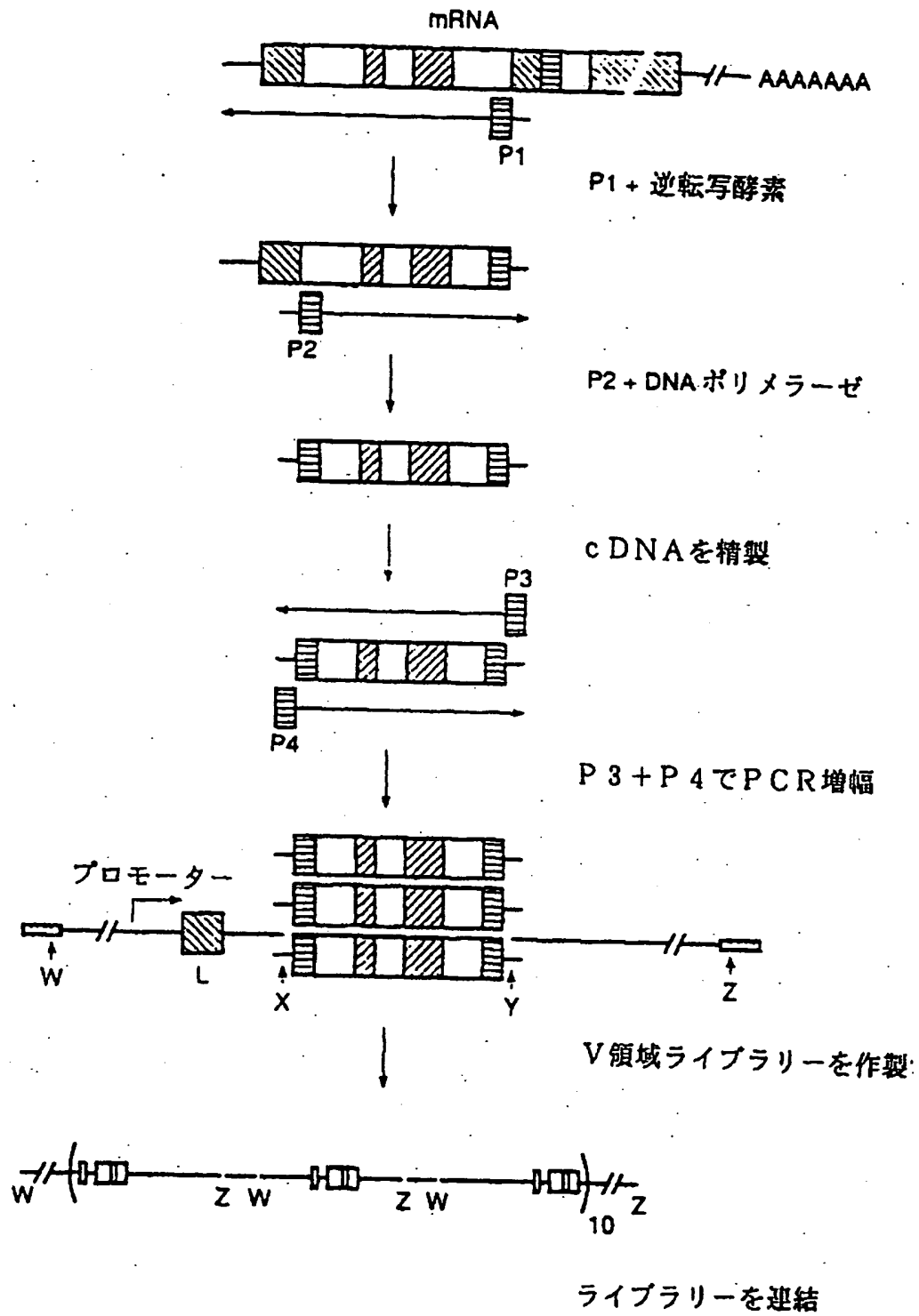
【第5図】



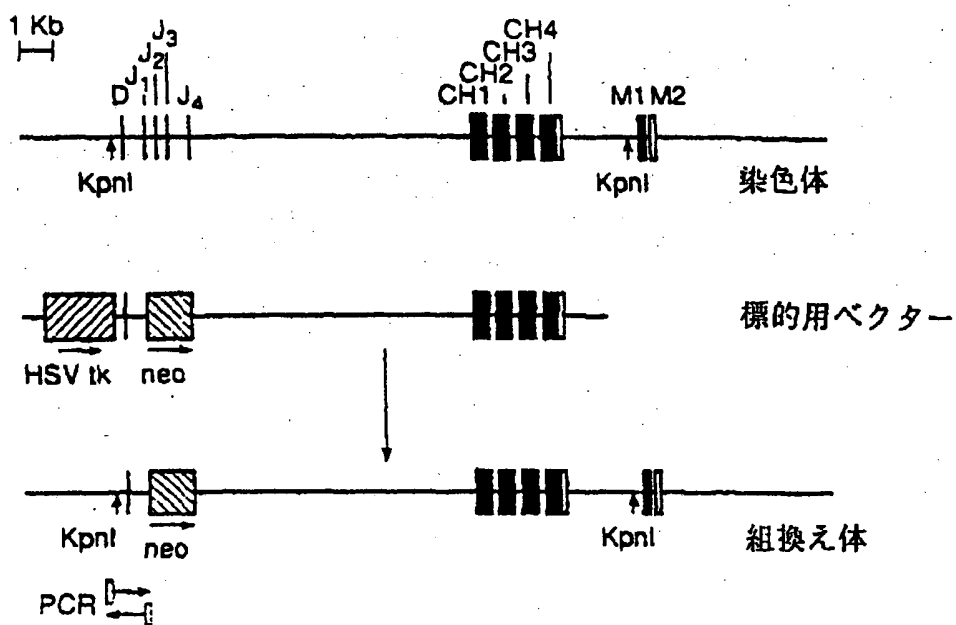
【第8図】



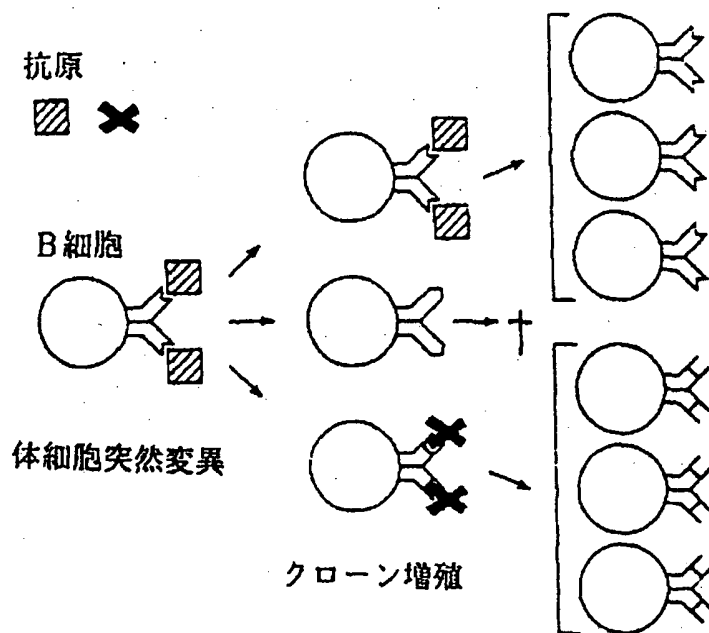
【第6図】



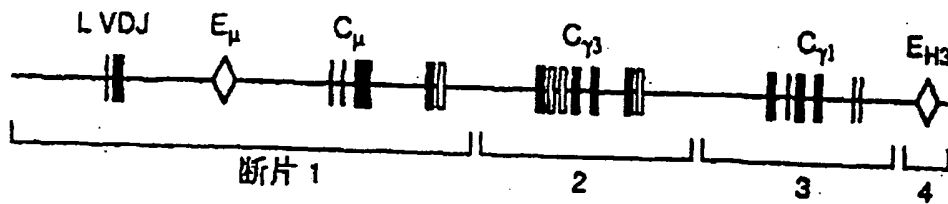
【第7図】



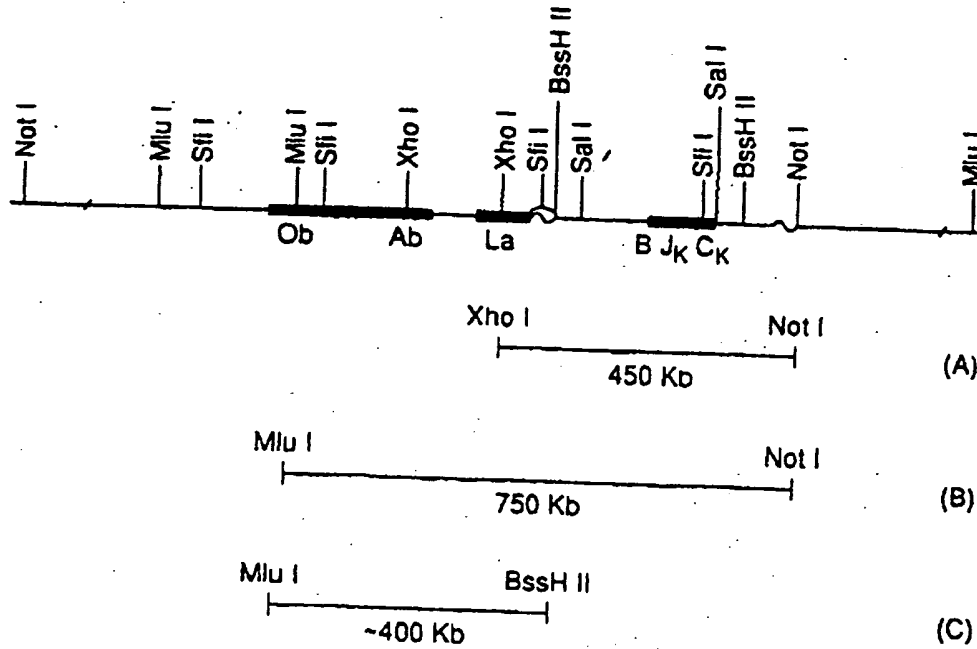
【第9図】



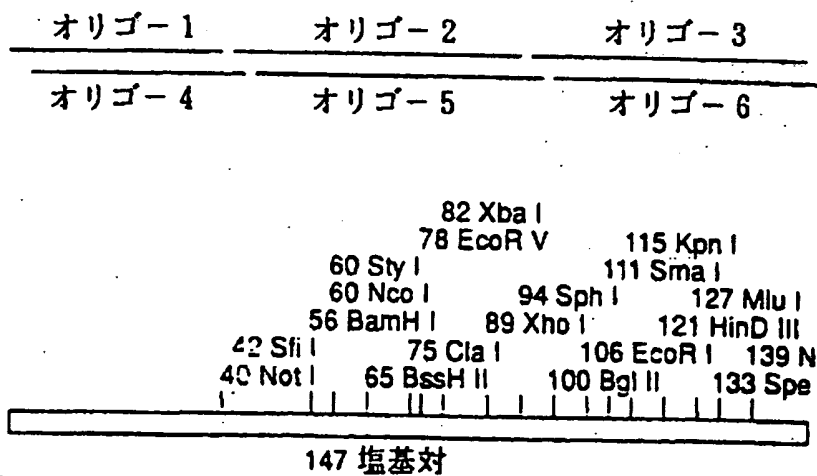
【第10図】



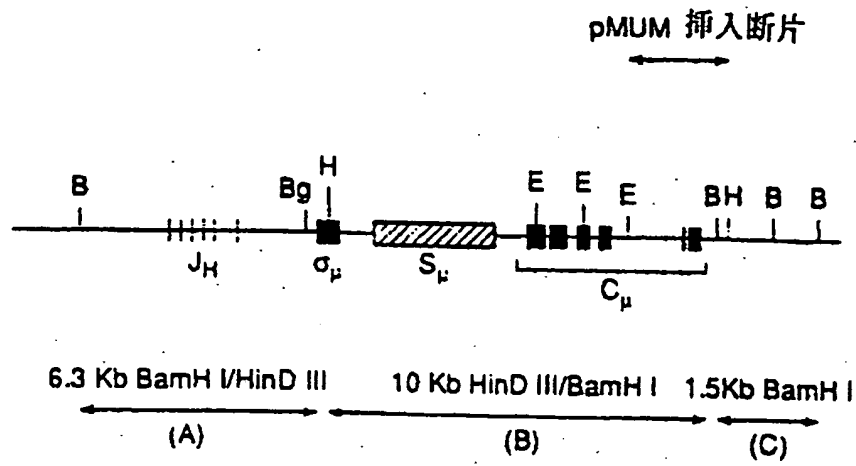
【第11図】



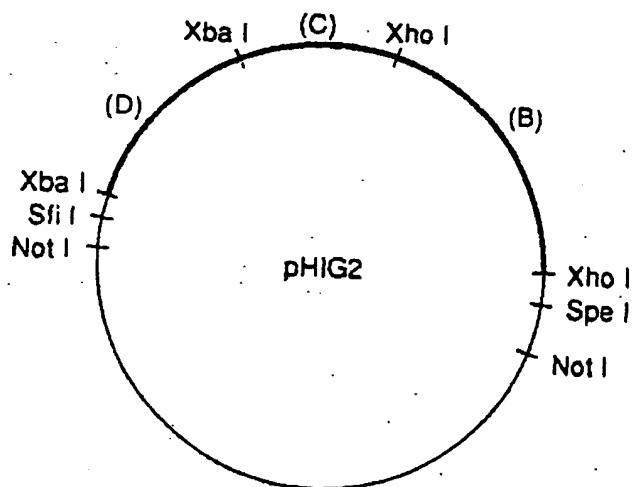
【第13図】



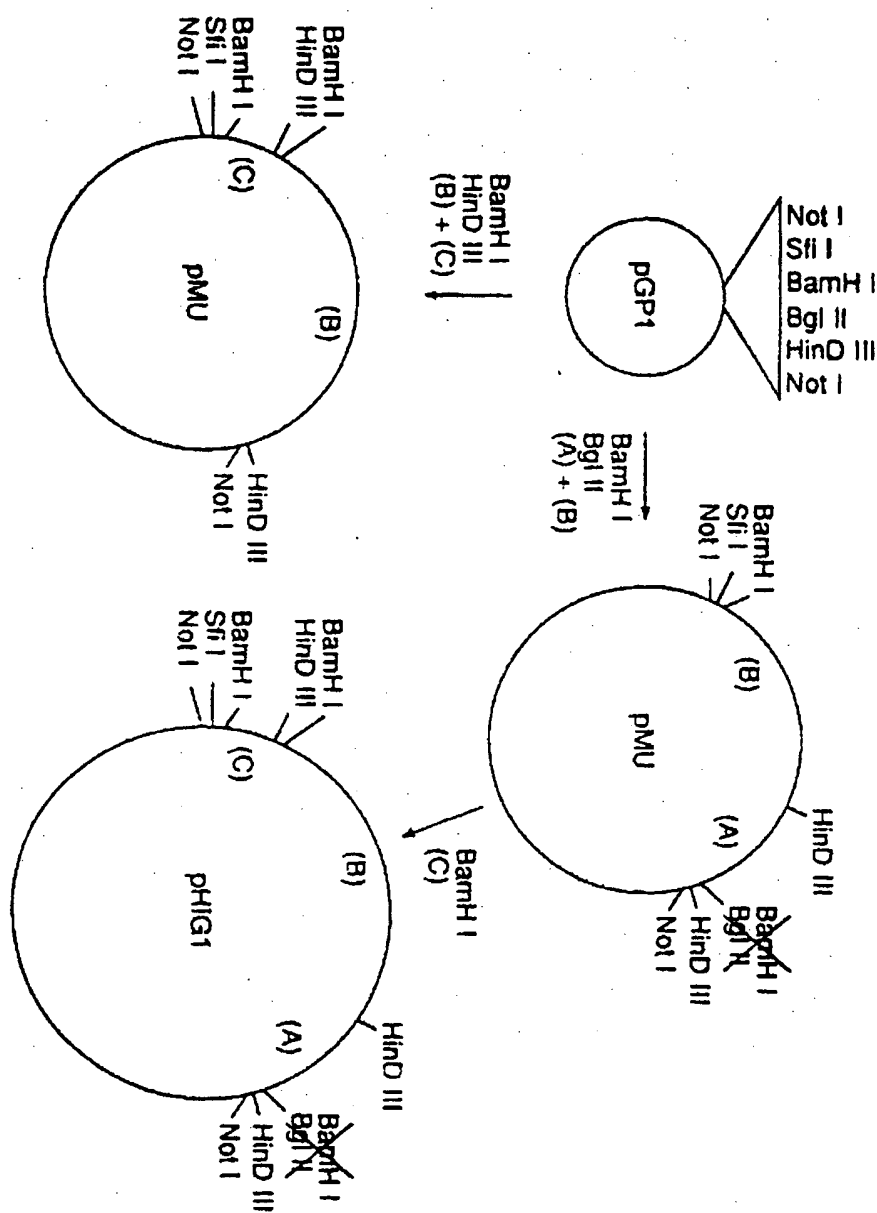
【第14図】

ヒト μ 遺伝子座

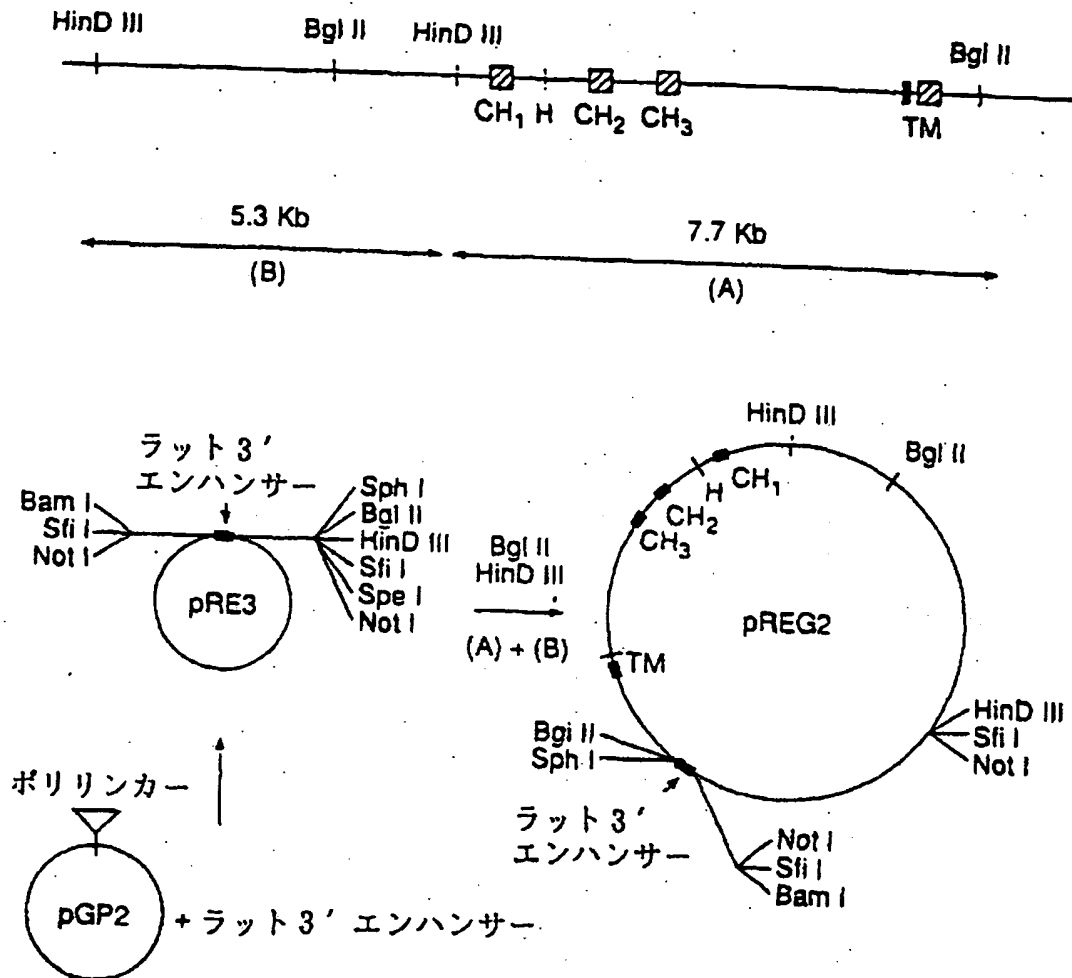
【第19図】



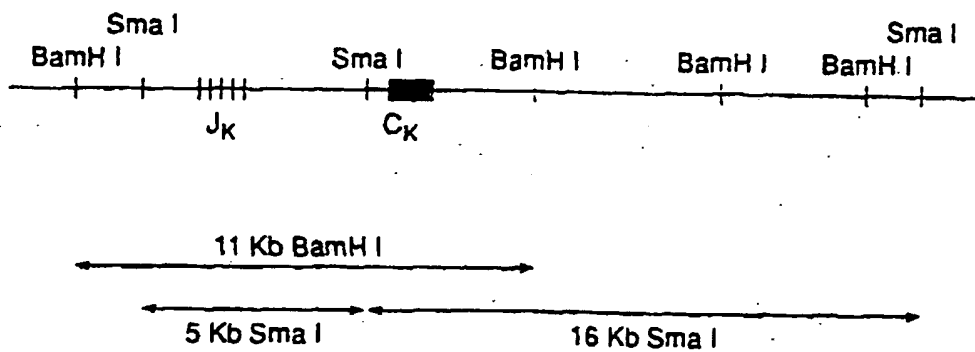
【第 1 5 図】



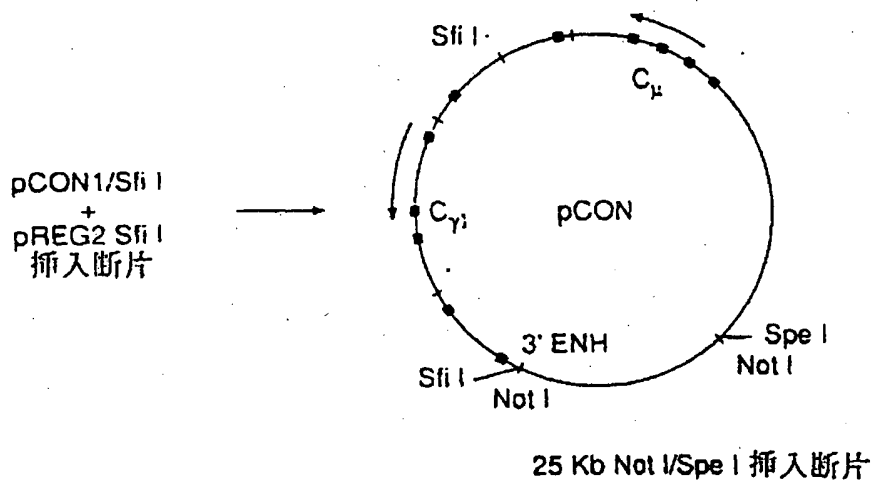
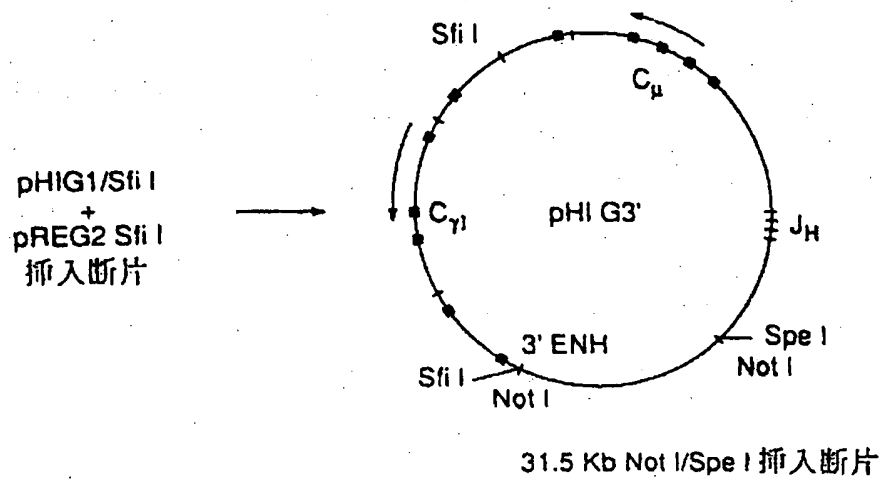
【第16図】

ヒトC_{γ1}遺伝子

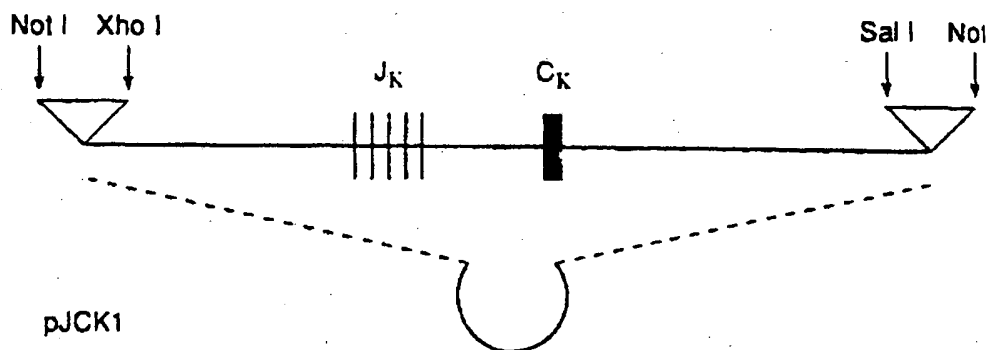
【第20図】



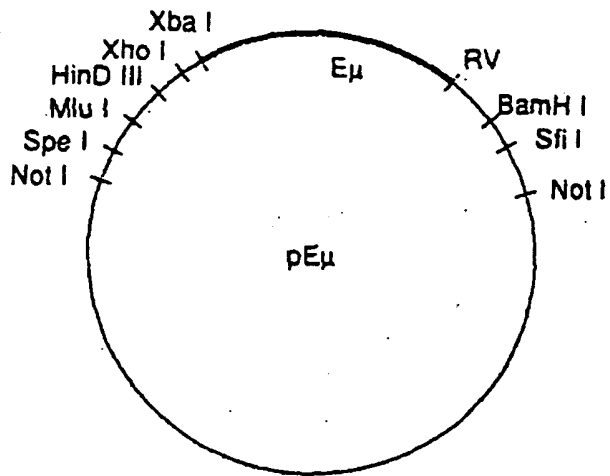
【第 17 図】



【第 34 図】

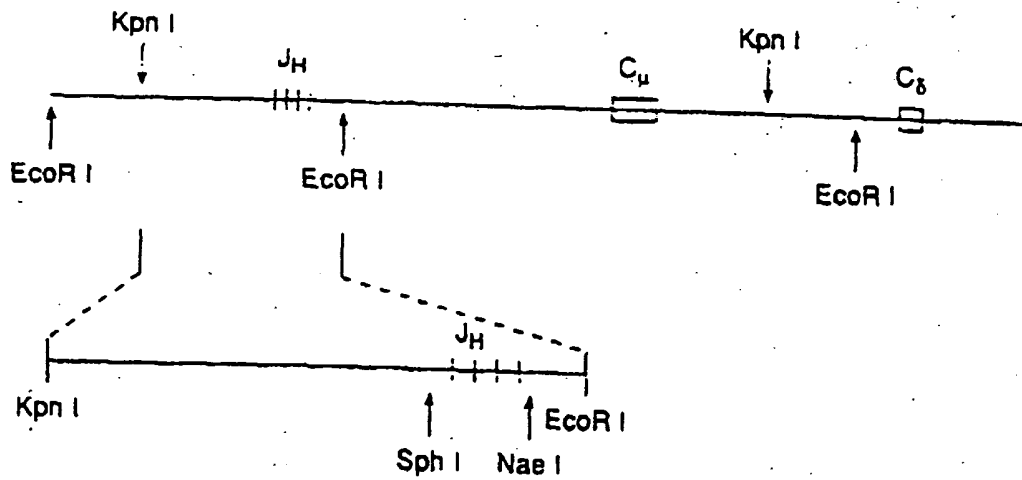


【第21図】

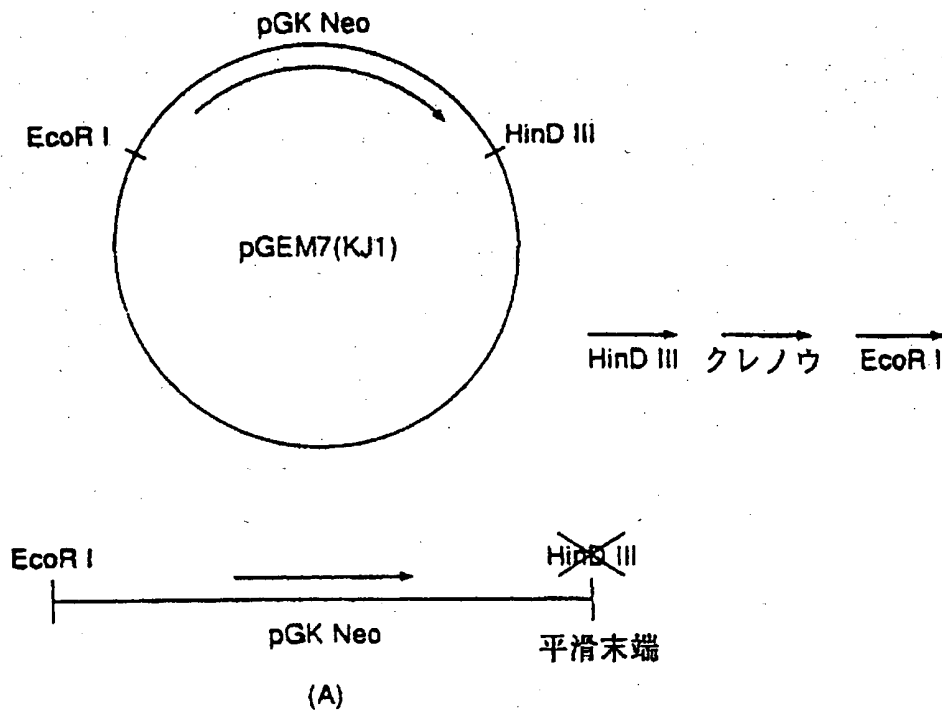


【第23a図】

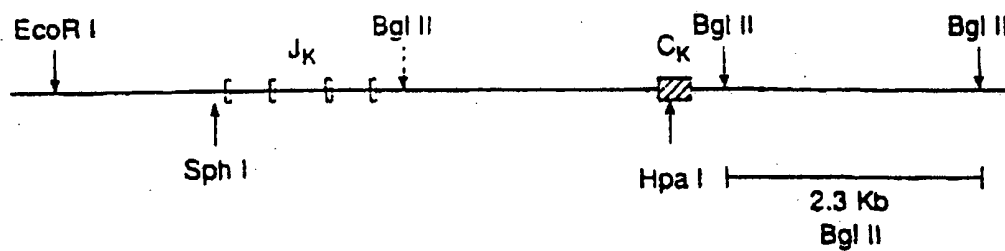
マウス重鎖遺伝子座



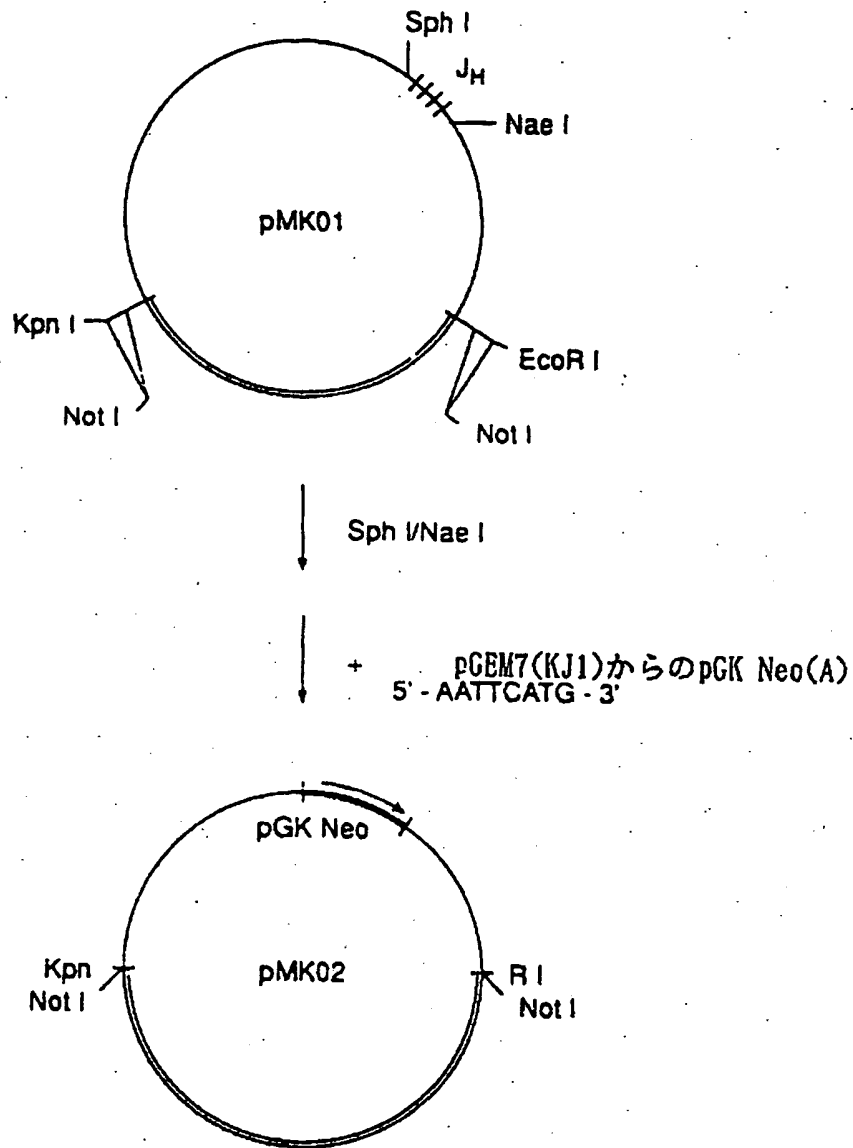
【第 2 3 b 図】



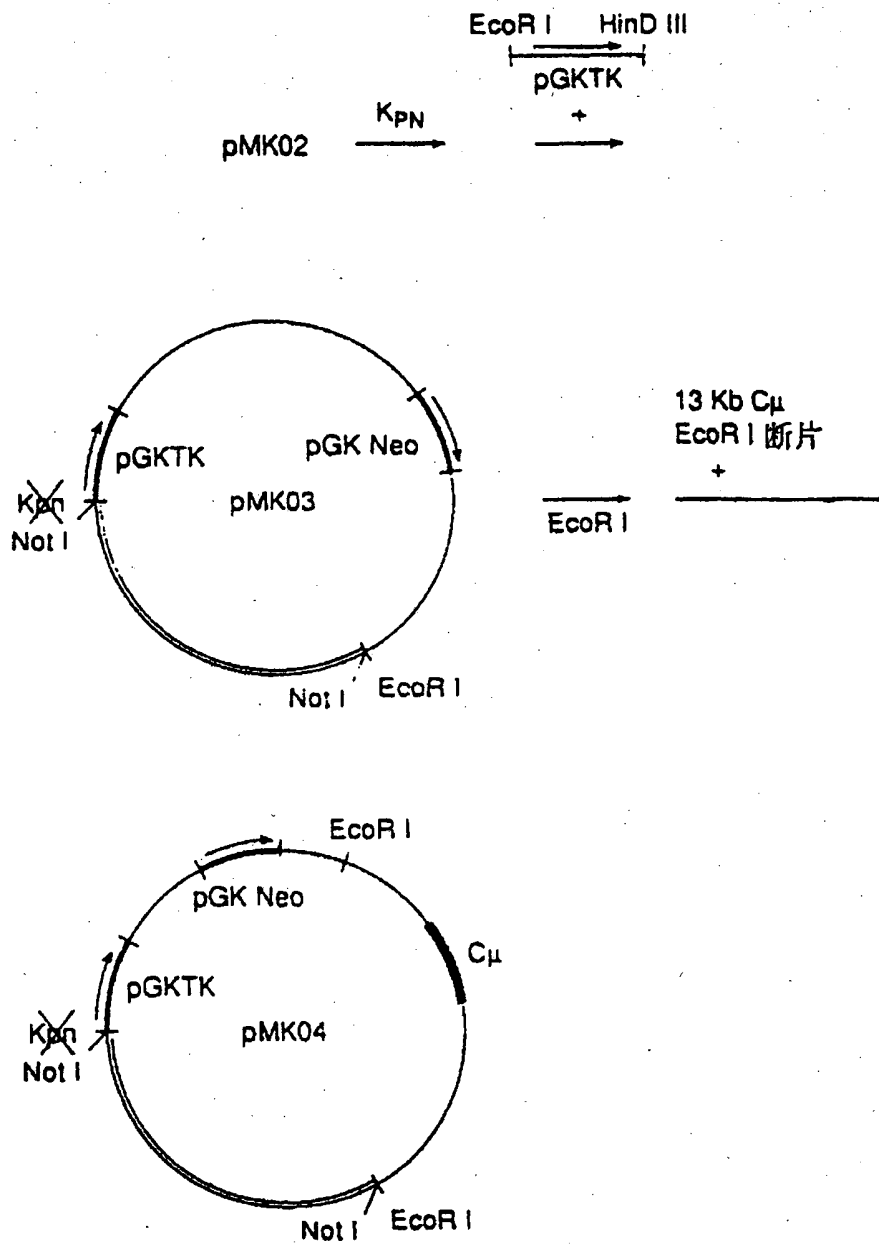
【第 2 4 a 図】

マウス κ 遺伝子

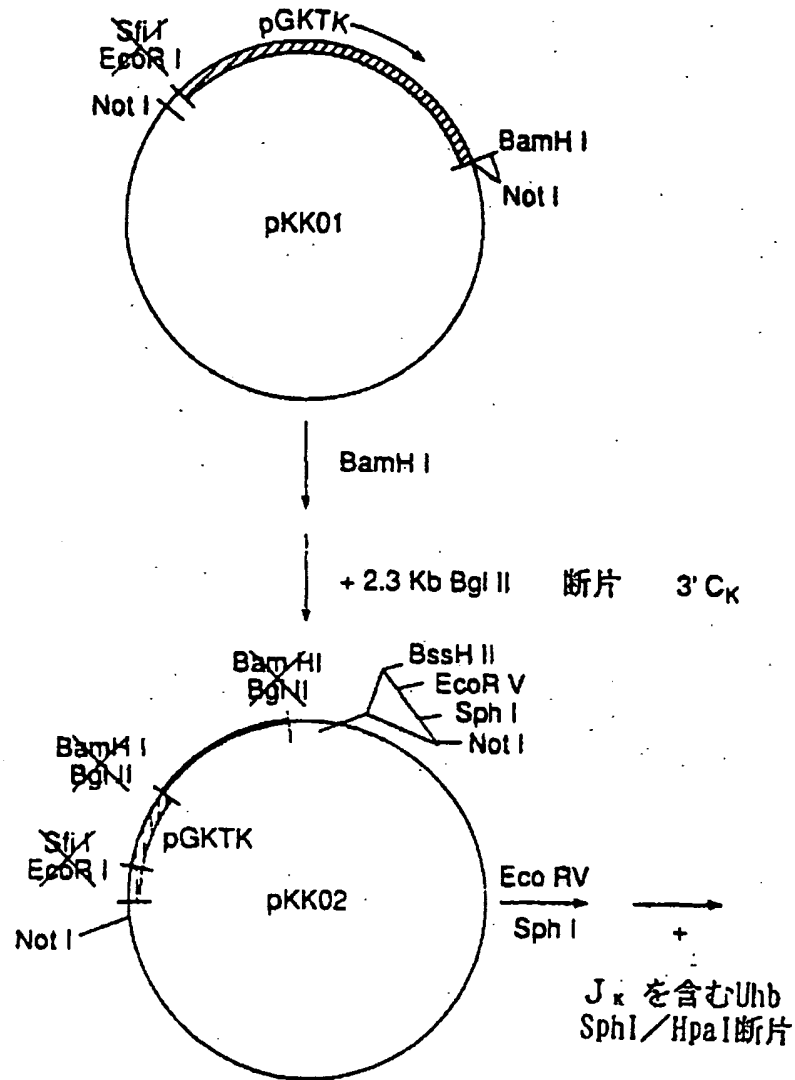
【第23c図】



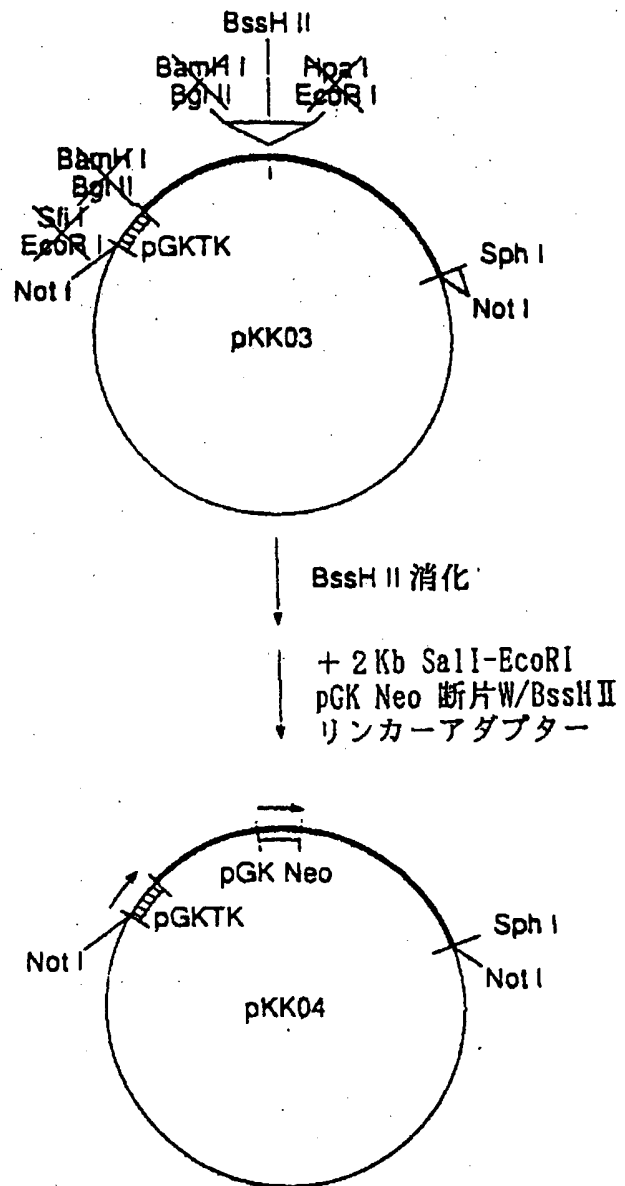
【第 23 d 図】



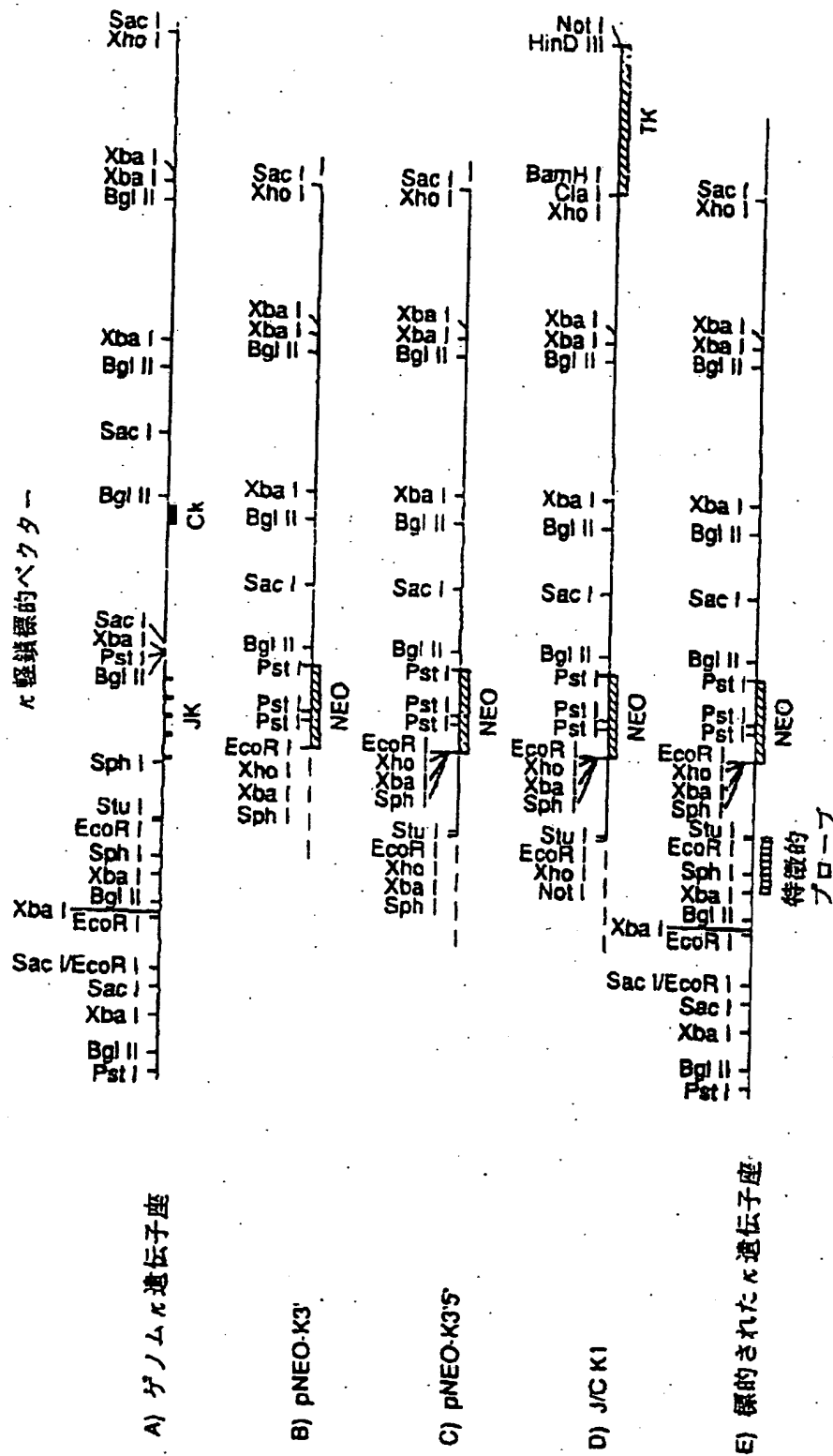
【第24b図】



【第24c図】

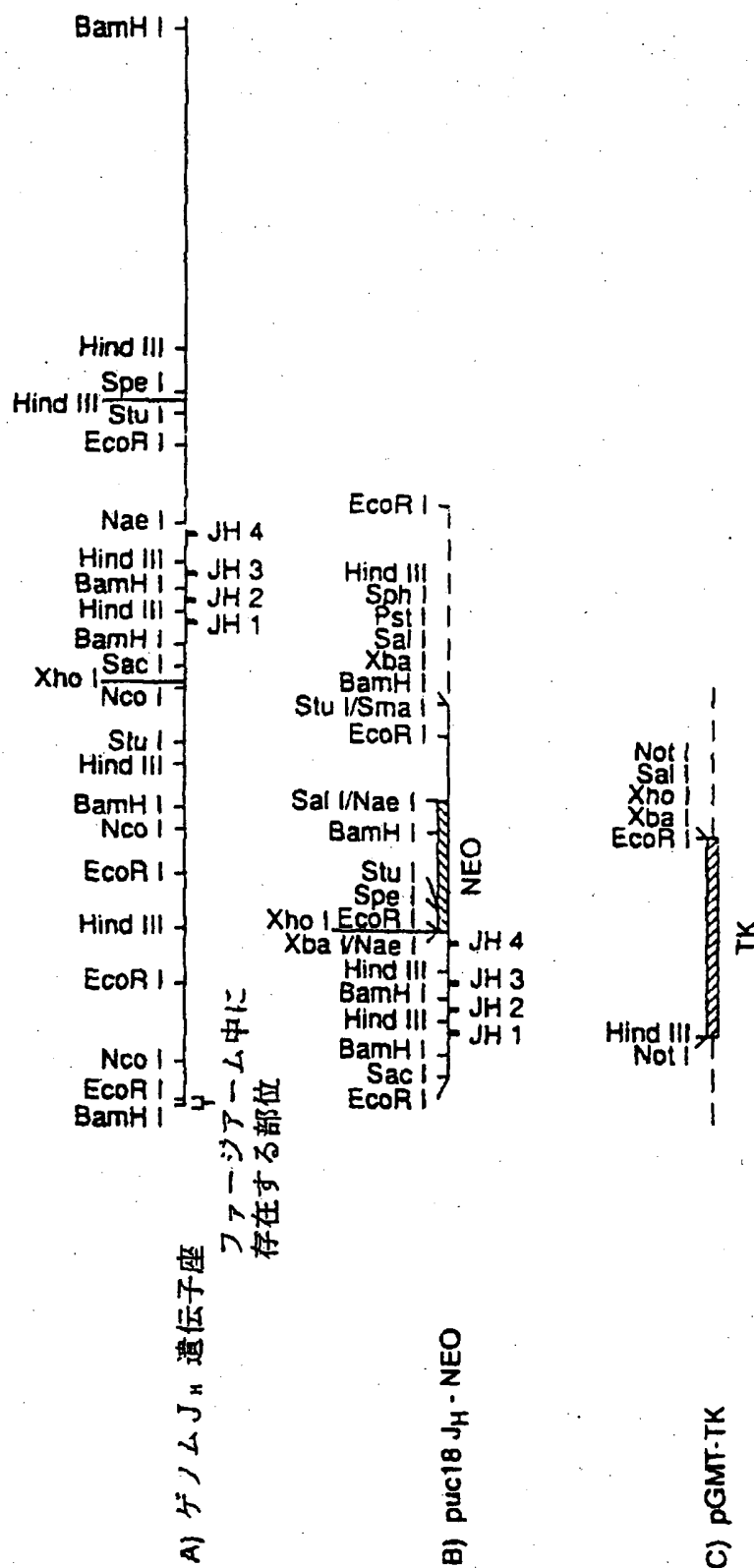


【第25図】



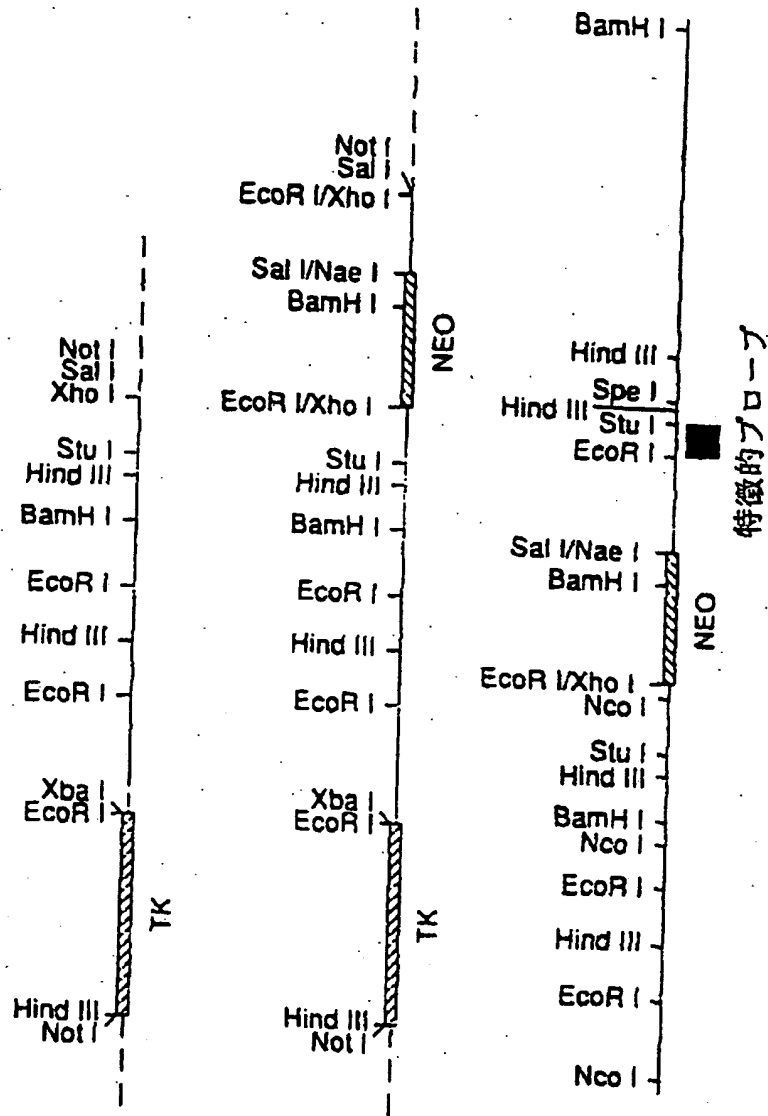
【第26a図】

マウス重鎖標的用ベクター



【第26b図】

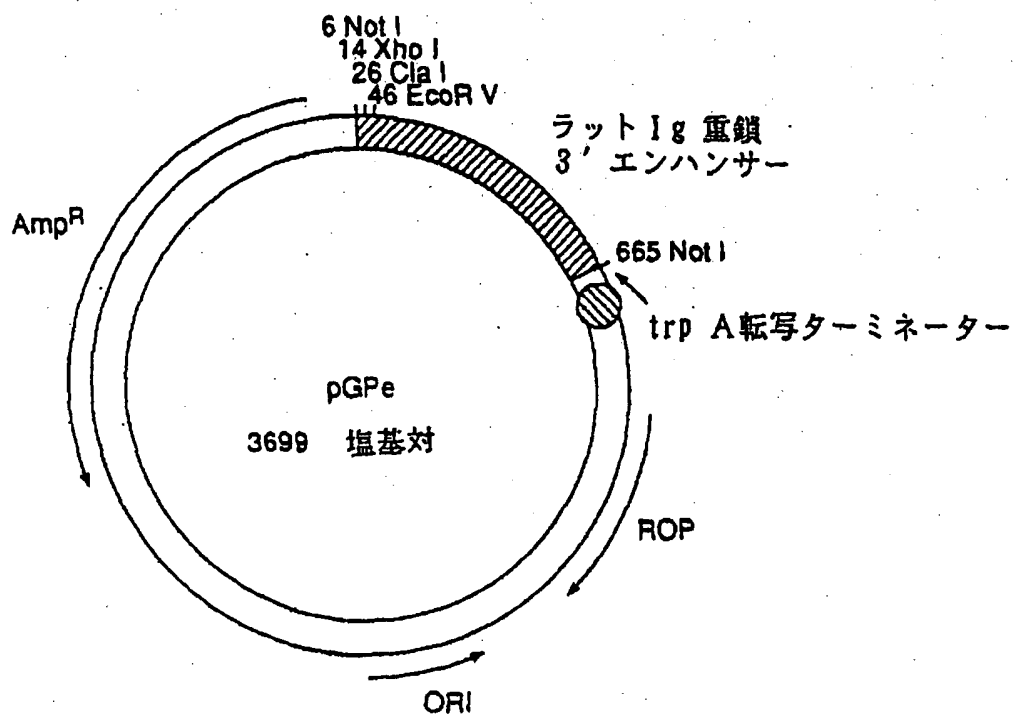
マウス重鎖標的用ベクター



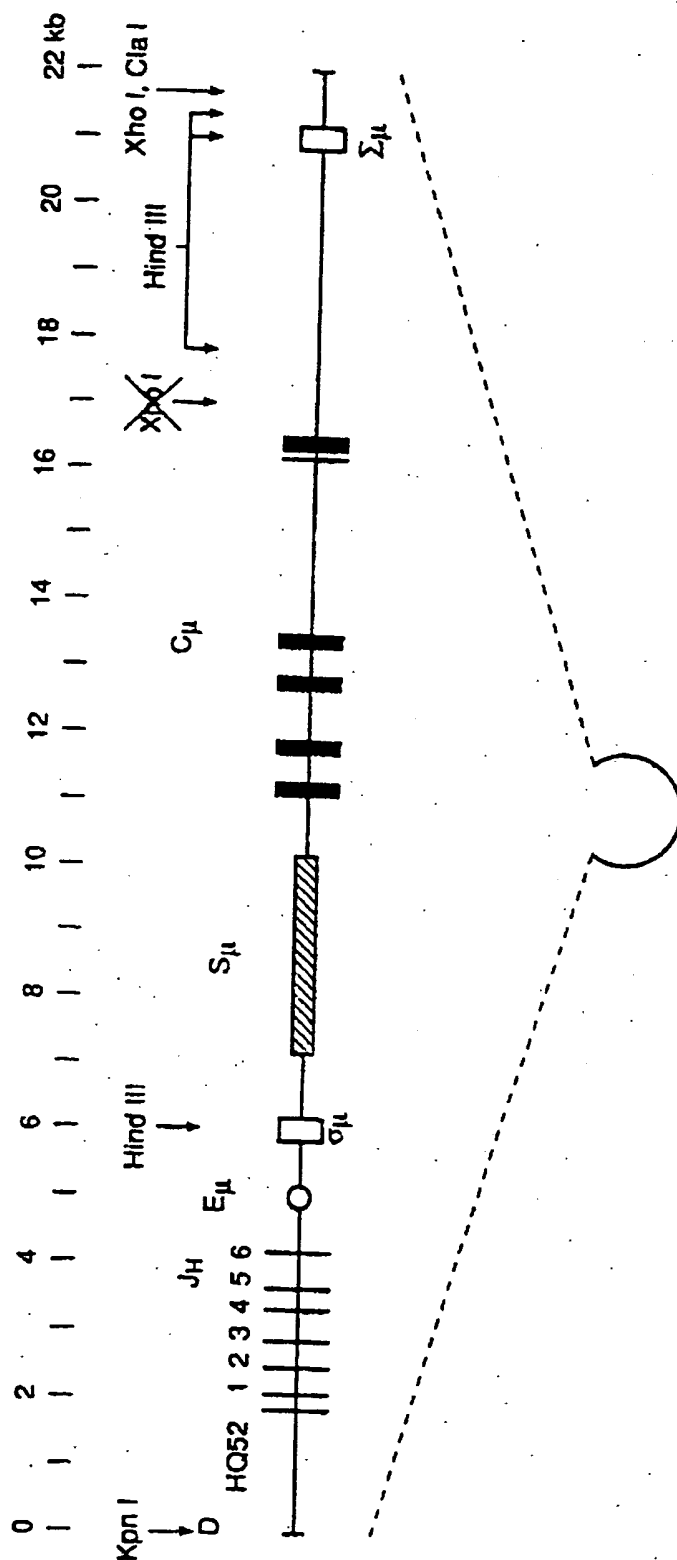
D) pGMT-TK-JH5

E) J_HK01F) 標的されたJ_H遺伝子座

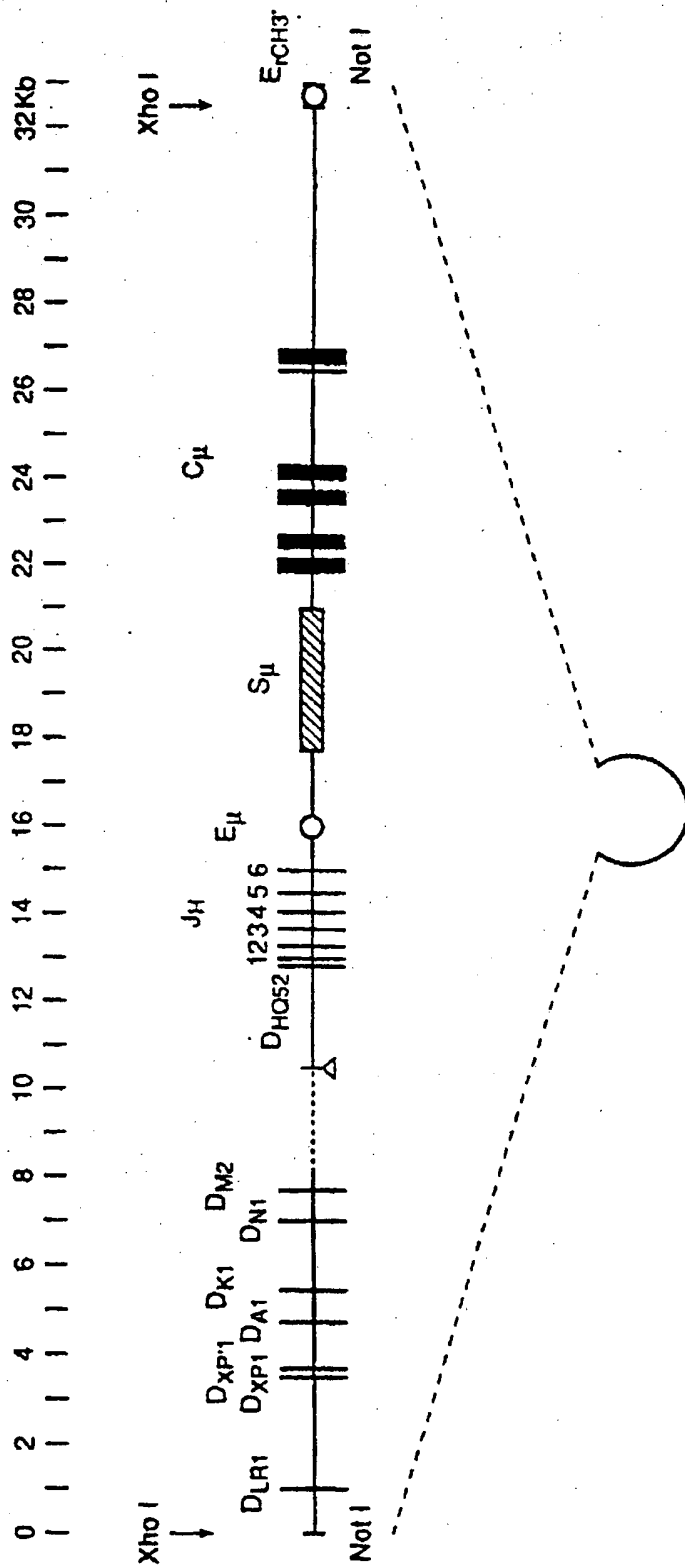
【第27図】



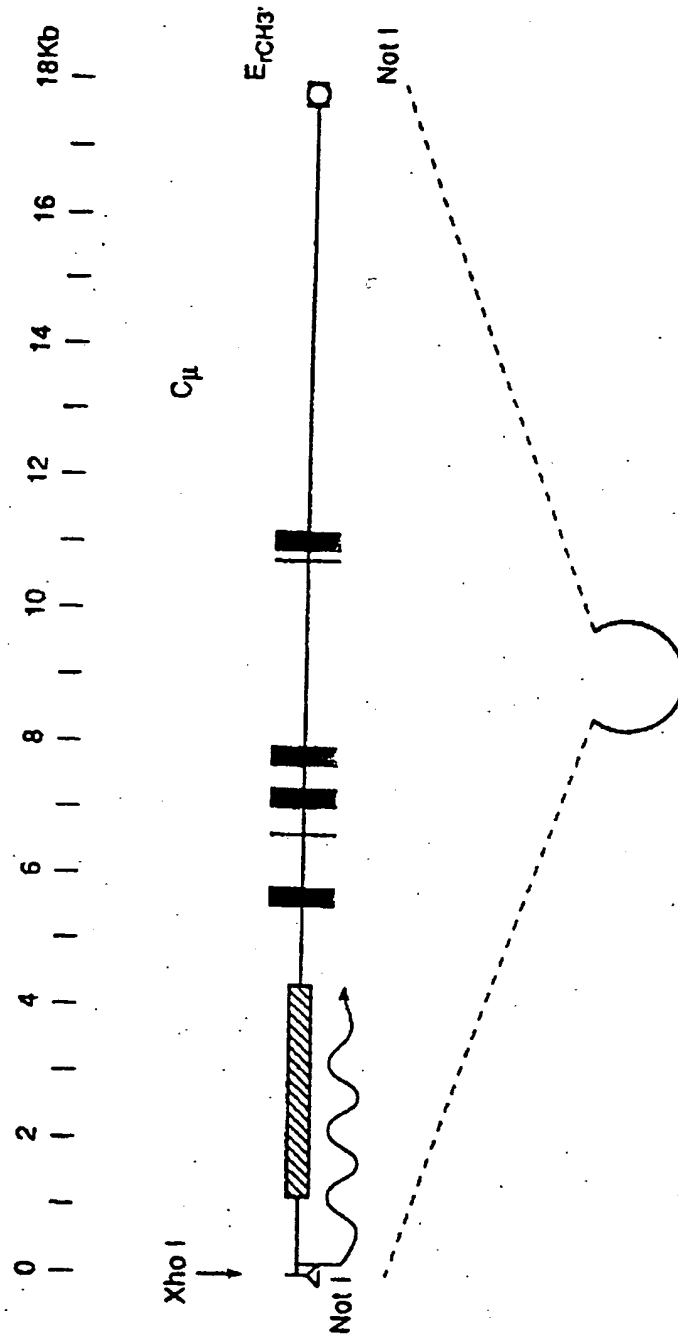
【第 28 図】



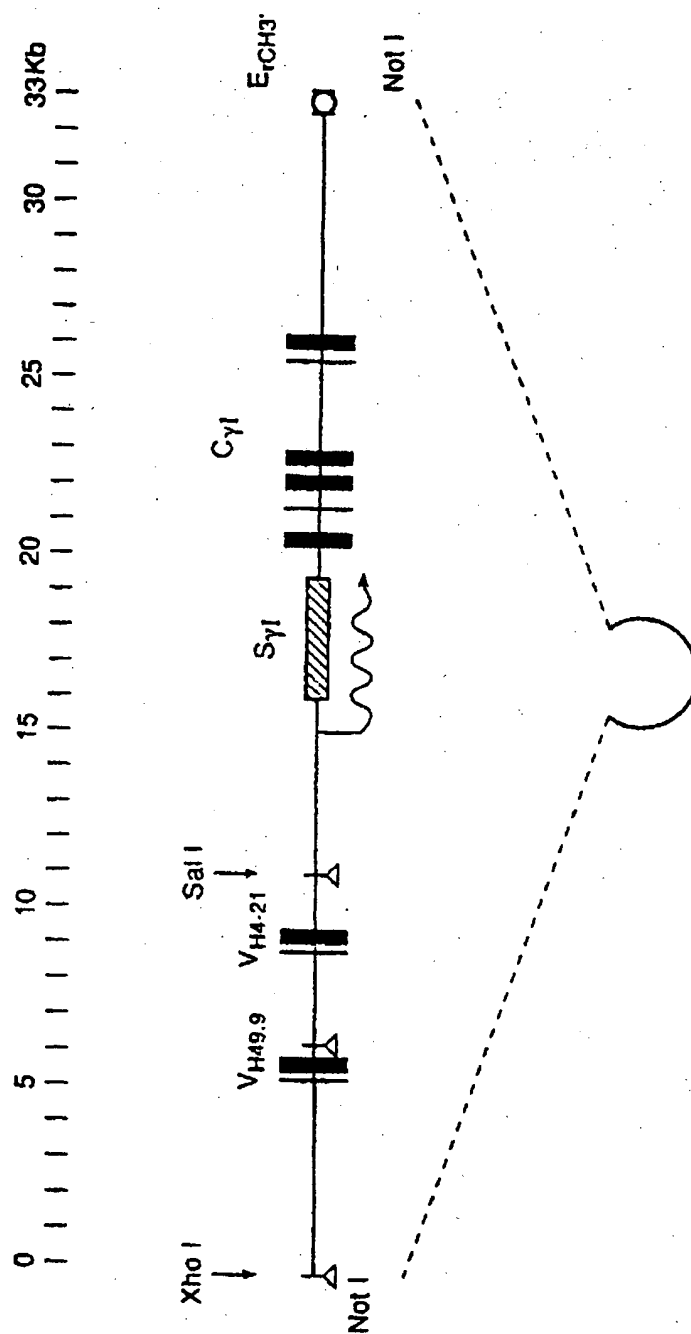
【第29図】



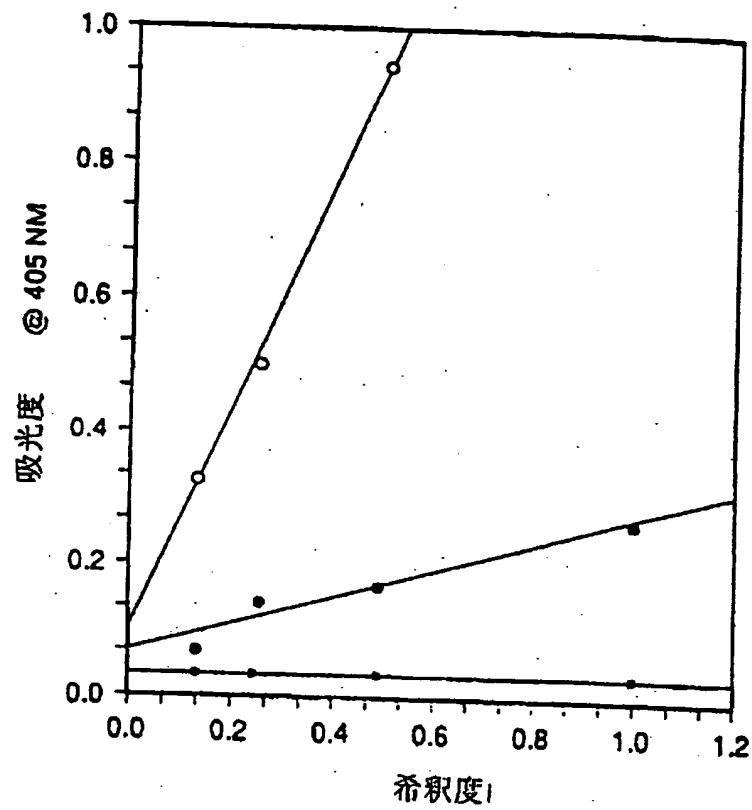
【第31図】



【第 3 2 図】

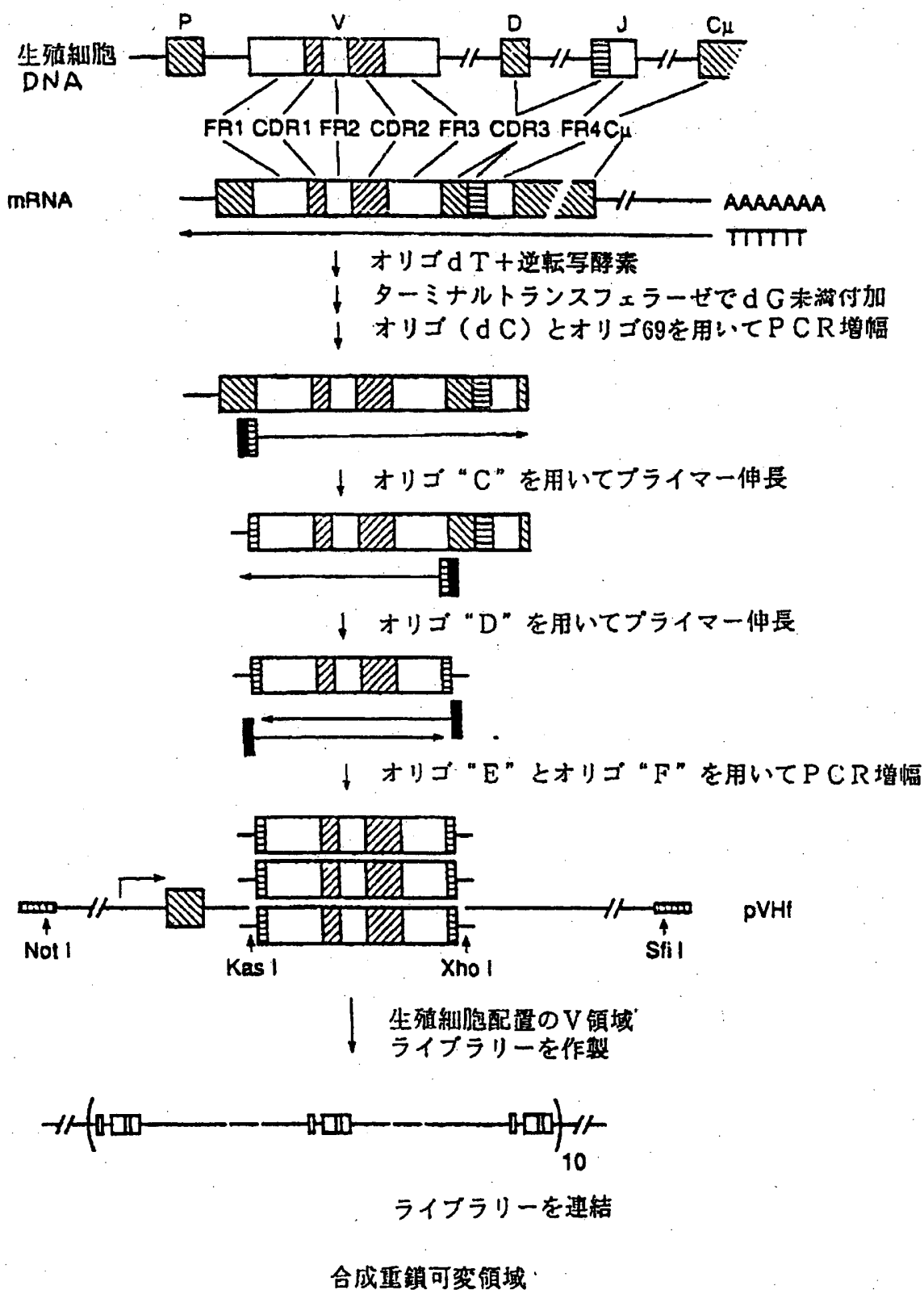


【第33図】



○ IgM } pHC1トランスジェニック
● IgG1 }
× IgM } 非トランスジェニック対照
+ IgG1 }

【第35図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. °

C12N 5/10

識別記号

FI

C12N 5/00

B

(56) 参考文献

特表 平4-504365 (JP, A)

Nucleic Acids Research, 20 [23] (1992) p. 6287-6295

International Immunology, 6 [4] (1994) p. 579-591

(58) 調査した分野(Int. Cl. °, DB名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

EPAT (QUESTEL)

